

**NORCOCLAURIN: DAS ZENTRALE ZWISCHENPRODUKT
IN DER BIOSYNTHESE DER BENZYLISOCHINOLIN-ALKALOIDE**

Susanne Löffler

Disbui. München

1988



Norcocclaurin: Das zentrale Zwischenprodukt

in der Biosynthese der

Benzylisochinolin-Alkaloide

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Susanne Löffler

aus

München

Januar 1988

1. Referent: Prof. Dr. M.H. Zenk

2. Referent: Prof. Dr. J. Stöckigt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.88

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	22
1. Pflanzliches Material	22
2. Spezielle Chemikalien	23
3. Geräte	24
4. Synthesen	24
4.1 Synthese von Natrium-N-Hydroxysulfosuccinimid	24
4.2 Synthese von 4-Hydroxy- und 3,4-Dihydroxyphenylacet- aldehyd	25
4.3 Darstellung von (R)- und (S)-6-OC ³ H ₃ -Cocclaurin und (R)- und (S)-6-O ¹⁴ CH ₃ -Cocclaurin	26
4.4 Darstellung von (R)- und (S)-N ¹⁴ CH ₃ -Cocclaurin	28
4.5 Darstellung von (R,S)-3- ¹⁴ C-Norcocclaurin und (R,S)- 3- ¹⁴ C-Norlaudanosolin	28
4.6 Darstellung von (R,S)-6-OC ³ H ₃ ,9- ¹⁴ C-Cocclaurin	29
4.7 Darstellung von 2,6- ³ H ₂ -Dopamin	30
4.8 Darstellung von 3,5- ³ H ₂ -Tyramin	30
4.9 Synthese von (R,S)-Isococclaurin	31
5. Herstellung zellfreier Enzympräparationen	31
5.1 Aufschluß pflanzlicher Zellkulturen	31
5.2 Aufschluß differenzierter Pflanzen	32

6. Enzymtests	32
6.1 Norcocclaurinsynthase	32
6.2 (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase und (R,S)-Norcoc- laurin-6-O-Methyltransferase	33
6.3 Phenolase	34
6.4 Cytochrom c - Reduktase	35
7. Immunologische Methoden	35
7.1 Immunisierung von Kaninchen mit (R)- und (S)-Cocclaurin- Konjugaten	35
7.2 Durchführung der Radioimmuntests	36
7.3 Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse	38
8. Applikationsexperimente	39
8.1 Applikation radioaktiv markierter Vorstufen an Pflanzen, Pflanzenteile und Kalluskulturen	39
8.2 Applikation ^{13}C -markierter Verbindungen an Keimlinge und ältere Pflanzen von <u>Papaver somniferum</u>	39
8.3 Aufarbeitung der Gewebe	40
8.4 Derivatisierung von radioaktiv markiertem Thebain	44
9. Elektrophoretische Trennverfahren	46
9.1 Isoelektrische Fokussierung	46
9.2 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese	47
10. Proteinbestimmung	48
11. Radioaktivitätsbestimmung	49
12. Chromatographische Methoden	49
13. Spektroskopische Methoden	50

III. ERGEBNISSE	52
1. Applikationsexperimente an <u>Papaver somniferum</u>	52
1.1 Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Thebain	52
1.2 Einbau ^{13}C -markierter Vorstufen in Opiumalkaloide	59
1.3 Einbau $1\text{-}^{13}\text{C}, 1\text{-}^2\text{H}$ -markierter Vorstufen in Thebain	68
2. Einbau von radioaktiv markiertem Cocclaurin in Stepharin ...	73
3. Taxonomische Verbreitung der Norcocclaurinsynthase	75
4. Taxonomische Verbreitung der SAM:(R,S)-Norcocclaurin 6-O-Methyltransferase	79
5. Reinigung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase aus Zellsuspensionskultur von <u>Tinospora cordifolia</u>	83
5.1 Gewebeaufschluß	84
5.2 Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose	85
5.3 Gelfiltration an TSK-Fractogel	85
5.4 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q	87
5.5 Affinitätschromatographie an Cocclaurin-gekoppelter epoxyaktivierter Sepharose	88
5.6 Präparative Diskelektrophorese im Polyacrylamidgel	91
5.7 Zusammenfassende Darstellung der Reinigung und Anreicherung	92
6. Charakterisierung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase	94
6.1 Identifizierung des Enzymproduktes	94
6.2 Molekulargewichtsbestimmung	96
6.3 pH-Optimum	98
6.4 Temperaturoptimum	99
6.5 Substratspezifität und Stereoselektivität	101

6.6	Kompetitive Hemmung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase durch SAH	107
6.7	Taxonomische Verbreitung von Cocclaurin-N-methylierender Enzymaktivität	109
6.8	Kinetik der Bildung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase in <u>Tinospora cordifolia</u>	113
6.9	Immobilisierung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase	115
6.10	Vergleichende Stabilität von löslicher und immobilisierter SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase	116
7.	Reinigung der Phenolase aus Zellsuspensionskultur von <u>Berberis stolonifera</u>	119
7.1	Gewebeaufschluß und Gelfiltration an G25	122
7.2	Kombinierte Chromatographie an Hydroxylapatit und DEAE-Sephacel	123
7.3	Ionenaustauschchromatographie an Q Sepharose Fast Flow	125
7.4	Ionenaustauschchromatographie an Mono Q	127
7.5	Isoelektrische Fokussierung im granulierten Flachgel ..	128
7.6	Zusammenfassende Darstellung der Reinigung und Homogenität	131
8.	Charakterisierung der Phenolase	134
8.1	Identifizierung der Enzymprodukte	134
8.2	Molekulargewichtsbestimmung	136
8.3	pH-Optimum	137
8.4	Temperaturoptimum	138
8.5	Substratspezifität	139
8.6	Hemmstoffe	144
9.	Aufbau eines Radioimmuntests für (S)- und (R)-Cocclaurin ...	147
9.1	Darstellung von (S)- und (R)-Cocclaurin-Konjugaten zur Erzeugung spezifischer Antikörper	148

9.2 Optimierung der Testbedingungen	151
9.3 Standardisierung der Tests	156
9.4 Bestimmung der Kreuzreaktionen	159
9.5 Nachweis von (S)- und (R)-Cocclaurin in Pflanzen, Pflanzenteilen und Zellkulturen	166
IV. DISKUSSION	172
V. ZUSAMMENFASSUNG	195
VI. LITERATURVERZEICHNIS	199

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (1 Ci = $2,2 \times 10^{12}$ Zerfälle pro Minute)
CI	Chemische Ionisation
cpm	Zählrate (counts per minute)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfallsrate (desintegrations per minute)
EDC	1-Ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid HCl
EI	Elektronenstoß Ionisation
FG	Frischgewicht
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunden
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
kD	kilo Dalton
LM	Laufmittel
Lux	Beleuchtungsstärke (=lumen/m ²)
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrum
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
RIA	Radioimmunoassay
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
STOX	(S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

I. EINLEITUNG

Unter den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen bilden die Isochinolinalkaloide diejenige Gruppe, die mit über 2000 bekannten Vertretern nicht nur eine der umfangreichsten ist, sondern die auch die größte Strukturvielfalt aufweist. So konnten bis 1982 über 57 unterschiedliche Strukturtypen aus ungefähr 40 Pflanzenfamilien isoliert werden. Dieser Reichtum an molekularer Vielgestaltigkeit und die weite Verbreitung im Pflanzenreich machte die Isochinolinalkaloide zu einem äußerst interessanten Gebiet für Chemiker, Biochemiker, Pharmazeuten, Systematiker und chemotaxonomisch orientierte Botaniker (BISSET, 1985).

Der ursprünglich wohl wichtigste Grund für das Interesse der Naturstoffchemiker an den Isochinolin- und isochinolinhaltigen Drogen ist aber in ihren ausgeprägten pharmakologischen Wirkungen zu sehen. So waren schon seit altersher isochinolinalkaloidhaltige Pflanzen als traditionelle Heilmittel bekannt gewesen und genutzt worden. Von diesen Drogen und ihren wirksamen Prinzipien spielen allerdings in der heutigen Therapie nur noch wenige eine Rolle. Als wichtigste positive Ausnahme muß dabei der Schlafmohn, Papaver somniferum genannt werden. Der getrocknete Milchsaft seiner Kapseln liefert nämlich eines der wenigen Pharmaka, die sich von der Antike (erste bekannte Erwähnung bei Theophrast von Ephesos um 370 v. Chr.) bis in die heutige Zeit in ungebrochener Folge im Arzneischatz erhalten haben (BISSET, 1985). Opium fehlte in keinem europäischen Kräuterbuch - sei es als Pharmakon und Rauschmittel oder als Instrument für magische Praktiken und Morde.

Den wirksamen Inhaltsstoffen des Opiums kam man aber erst auf die Spur, als es dem Apotheker Sertürner 1806 gelang, das "principium somniferum", nämlich das Morphin zu isolieren. Die Entdeckung des Morphins und die erste Isolierung einer organischen Base aus einer Pflanze sind als der Beginn der Alkaloidchemie und insbesondere als der Ausgangspunkt

für die Erforschung weiterer Bestandteile des Opiums anzusehen. So wurden in der Folge die Opiumalkaloide Noscapin (Robiquet, 1817), Codein (Robiquet, 1832), Thebain (Pelletier, 1835) und Papaverin (Merck, 1848) entdeckt.

Pharmakologisch gesehen sind die Opiumalkaloide auch heute noch von größtem Interesse (MUTSCHLER, 1981; Forth et al., 1983). Morphin ist eines der wirksamsten, zentral angreifenden Analgetica; es wird jedoch nur bei intensivsten Schmerzen eingesetzt, da ständiger Gebrauch schnell zu einer physischen und psychischen Abhängigkeit führen kann. Darüberhinaus dämpft Morphin das Atemzentrum und den Hustenreiz und hemmt die Darmperistaltik. Dadurch ist auch die obstipierende Wirkung von Opium zu erklären. Der Versuch, ausgehend von den Strukturmerkmalen des Morphins synthetische Opioide ohne Suchtpotential herzustellen, erwies sich bisher als nicht erfolgreich durchführbar (DÖRNER, 1986).

Codein, der Monomethylether des Morphins, und Noscapin besitzen eine wesentlich geringere schmerzstillende Wirkung als Morphin; sie vermögen jedoch die Wirkung anderer Analgetica zu potenzieren. Eingesetzt werden beide Substanzen als Antitussiva, wobei die auf ein Minimum reduzierte Suchtgefahr von großem Vorteil ist.

Dem Papaverin fehlt die zentralanalgetische Wirkung der vorgenannten Opiumalkaloide. Als muskulotrop wirkendes Spasmolyticum ist es z.B. bei peripheren Durchblutungsstörungen indiziert. Thebain hat aufgrund seiner krampferregenden Wirkung keinen therapeutischen Nutzen; es dient jedoch als Ausgangsverbindung zur Partialsynthese einiger Analgetica oder Morphinantagonisten wie z.B. Oxycodon, Buprenorphin, Diprenorphin und Naloxon (SAWA et al., 1961; SCHRÖDER et al., 1982).

Auch andere Strukturtypen aus der Gruppe der Isochinolinalkaloide haben noch pharmakologische Bedeutung. (+)-Tubocurarin, das Hauptalkaloid des aus Chondodendron tomentosum gewonnenen Pfeilgiftes Curare, ist ein quarternäres Bisbenzylisochinolinalkaloid. Seine muskelrelaxierende Wirkung

wird zur Ruhigstellung des Operationsfeldes ausgenutzt (FORTH et al., 1983; BISSET, 1985). Berberin aus der Reihe der Protoberberine ist aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung gegenüber Pilzen, Protozoen und Bakterien auf dem deutschen Markt Bestandteil von Augentropfen, die bei Bindehautentzündung eingesetzt werden (PREININGER, 1975). Für das Proaporphin Glaziovine wurde antidepressive Wirkung gefunden (FERRARI und CASAGRANDE, 1975). Emetin und das nur synthetisch zugängliche 2,3-Dehydroemetin sind als Chemotherapeutika gegen Amöbenruhr wirksam (MUTSCHLER, 1981).

Neben der Entdeckung und Konstitutionsaufklärung neuer, wenn auch nicht immer pharmazeutisch wichtiger Isochinolinalkaloide weckte bald die Frage das wissenschaftliche Interesse, wie diese Inhaltsstoffe in der Pflanze entstehen. So hatten Winterstein und Trier bereits 1910 die erste Hypothese zur Biosynthese der Benzyltetrahydroisochinoline formuliert. Sie postulierten, daß das durch Zerfall von "Eiweißkörpern" entstehende Phenylalanin, Tyrosin und 3,4-Dihydroxyphenylalanin in verschiedene Richtungen abgebaut werden. Das nach Decarboxylierung entstandene Amin und der durch Reduktion gebildete Aldehyd sollten anschließend in einer Art Pictet-Spengler-Reaktion zu einer Benzylisochinolinverbindung kondensieren (vgl. Abb. 1; WINTERSTEIN und TRIER, 1910; PICTET und SPENGLER, 1911).

Diese Hypothese, die bis heute als maßgebende Grundlage der Alkaloidbiosynthese gilt, wurde von R. ROBINSON übernommen und 1917 in seiner Arbeit über "A Theory of the Mechanism of the Phytochemical Synthesis of certain Alkaloids" vertieft. Er postulierte erstmals Norlaudanosolin, das im Sinne der Hypothese von Winterstein und Trier durch die Kondensation von 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd mit Dopamin entstehen soll, formal als Vorstufe für viele weitere Benzylisochinolinalkaloide. Er erkannte damit auch die strukturelle Beziehung zwischen dem Benzylisochinolin- und z.B. dem Hydrophenanthren- oder dem Aporphingerüst.

Eine Bestätigung fand die Hypothese von Winterstein und Trier und Robinson, als es in der Folge gelang, Isochinoline unter "zellmöglichen" Bedingungen, d.h. bei Zimmertemperatur, geeigneter Konzentration und in einem um den Neutralpunkt begrenzten pH-Bereich, präparativ darzustellen (SCHÖPF und BAYERLE, 1934; SCHÖPF und SALZER, 1940). Diese Arbeiten

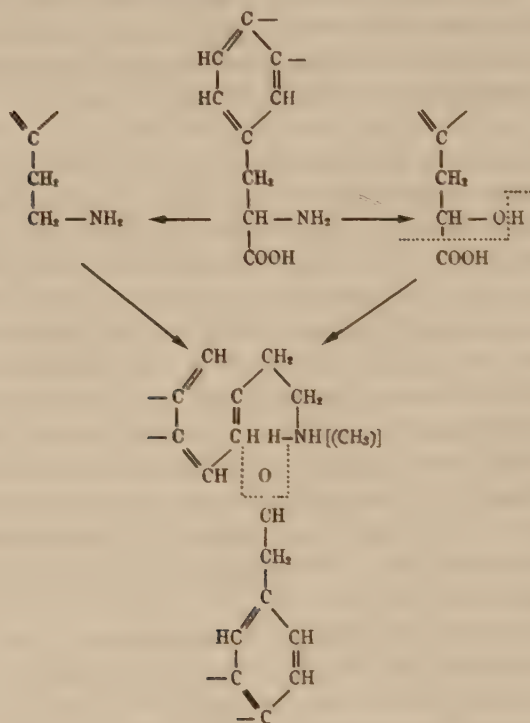


Abb. 1 Biosynthese des Benzylisochinolingerüsts aus aromatischen Aminosäuren (Original aus WINTERSTEIN und TRIER, 1910).

zeigten auch, daß im Phenylethylamin in p-Stellung zu der Position des Ringschlusses eine freie Hydroxylgruppe vorhanden sein muß, da O-methylierte Verbindungen unter physiologischen Bedingungen zu reaktionsträge sind.

Als Ende der fünfziger Jahre radioaktiv markierte Vorstufen verfügbar waren, konnten mit Hilfe von Fütterungsexperimenten an isochinolinhaltigen Pflanzen die Hypothesen von Winterstein und Trier und Robinson experimentell überprüft werden. Es sollte der Beweis geführt werden, daß die beiden C_6-C_2 -Einheiten, die sich von Tyrosin und 3,4-Dihydroxyphenylalanin ableiten, das Norlaudanოსolingerüst und damit z.B. auch das Ringsystem der Hydrophenanthrene, Protoberberine, Phthalidisochinoline und Benzophenanthridine aufbauen. Nach der Hypothese von Winterstein und Trier sollte nämlich Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und dieses weiter zu Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd umgesetzt werden. Diese beiden C_6-C_2 -Einheiten, die im Benzolring jeweils zweifach hydroxyliert sind, sollten dann direkt zu Norlaudanოსolin kondensieren. Folglich müßte bei Applikationsexperimenten mit radiomarkiertem Tyrosin, dem Vorläufer von Dopa, die Radioaktivität an zwei Positionen im Benzylisochinolin-gerüst wiederzufinden sein.

Eines der ersten derartigen Experimente wurde mit uniform markiertem Tyrosin (^{14}C) an isolierten Blättern und Kapseln von Papaver somniferum durchgeführt (KLEINSCHMIDT und MOTHES, 1959) und die Radioaktivität sowohl in den Alkaloiden des Morphin- wie auch des Papaverin- und des Narkotin-Typs festgestellt. Die Radioaktivitätsverteilung im isolierten Morphinmolekül konnte jedoch nicht genauer untersucht werden.

Bei allen folgenden Fütterungsexperimenten mit DL-2- ^{14}C -Tyrosin an Papaver somniferum wurden die isolierten Alkaloide Papaverin (BATTERSBY und HARPER, 1959 und 1962), Morphin (LEETE, 1959; BATTERSBY et al., 1960 und 1962) und Narcotin (BATTERSBY und McCALDIN, 1962) chemisch abgebaut und die Radioaktivitätsverteilung an den einzelnen C-Atomen genau bestimmt. Es fanden sich in den drei untersuchten Alkaloiden jeweils zwei markierte Zentren, nämlich am C-1-Atom der nach der Hypothese von Winterstein und Trier und Robinson aus Phenylethylamin und der aus Phenylacetaldehyd



entstandenen Hälfte. Jede markierte Position trug 50% der Gesamtradioaktivitätsmenge. Daraus folgte, daß das Benzylisochinolingerüst tatsächlich aus zwei von Tyrosin abgeleiteten C₆-C₂-Einheiten zusammengesetzt sein mußte.

Erweitert wurden diese Ergebnisse, als nach Fütterungsversuchen mit DL-2-¹⁴C-Tyrosin die Isochinolinalkaloide Hydrastin (GEAR und SPENSER, 1961) und Berberin (SPENSER und GEAR, 1962) aus Hydrastis canadensis, Chelidonin aus Chelidonium majus (LEETE, 1963) und Thebain aus Papaver bracteatum (NEUBAUER, 1965) isoliert und chemisch abgebaut wurden. Es wurde festgestellt, daß wiederum der Einbau von zwei Tyrosineinheiten erfolgt war. Die beiden betreffenden C-Atome in Thebain, Hydrastin und Chelidonin waren aber unterschiedlich stark radioaktiv markiert. Zu einem ebenso auffälligen Ergebnis kamen Rapoport und seine Mitarbeiter bei Applikationsexperimenten mit ¹⁴CO₂ an Papaver somniferum: Isoliertes radiomarkiertes Morphin war zu den beiden postulierten Tyrosinresten abgebaut und ein Aktivitätsverhältnis zwischen diesen Resten von 3:2 bis 8:1 statt der erwarteten 1:1-Verteilung gefunden worden (RAPOPORT et al., 1961). Ferner wurde nachgewiesen, daß ¹⁴C-Dopamin in Hydrastin (GEAR und SPENSER, 1963), Berberin (MONKOVIC und SPENSER, 1964 und 1965), Chelidonin (LEETE und MURRILL, 1964), Morphin (LEETE und MURRILL, 1964; BATTERSBY und FRANCIS, 1964) und Codein (BATTERSBY und FRANCIS, 1964) ausschließlich in den Isochinolinteil, also in die obere Hälfte des Benzylisochinolingerüsts eingebaut wurde. Eine Zusammenfassung der Applikationsexperimente mit ¹⁴C-Tyrosin und ¹⁴C-Dopamin ist in Abbildung 2 dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse zog Spenser in seiner bemerkenswerten Abhandlung über "The Biosynthesis of Alkaloids and other Nitrogenous Secondary Metabolites" folgenden Schluß: "These findings indicate that the two C₆-C₂-units, derived from tyrosine, which are incorporated into the alkaloids under discussion, differ from one another" (SPENSER, 1968). Die Biosynthese der Benzylisochinoline kann also

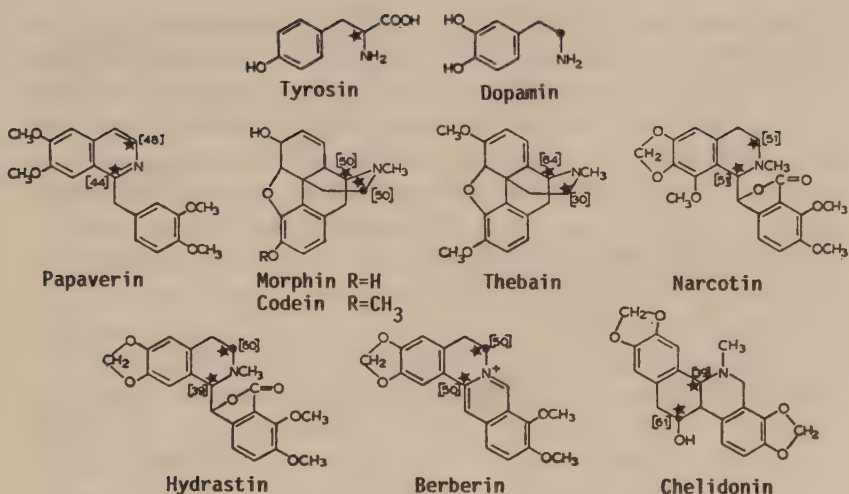


Abb. 2 Einbau von 2-¹⁴C-Tyrosin (*) und 1-¹⁴C-Dopamin (●) in Benzylisochinolinalkaloide. Die Zahlen geben den relativen Einbau (Gesamt-molekül = 100) von 2-¹⁴C-Tyrosin an den gekennzeichneten C-Atomen (*) an (Original aus SPENSER, 1968).

weder über die Kondensation zweier gleicher Moleküle noch über ein symmetrisches Zwischenprodukt ablaufen. Vielmehr muß Tyrosin zu zwei verschiedenen Verbindungen metabolisiert werden, die dann zum Benzylisochinolin kondensieren.

Neben dem Nachweis, daß aromatische Aminosäuren das Benzylisochinolingerüsts aufbauen, fand die Hypothese von Winterstein und Trier und Robinson, nach der Norlauidanosolin als erstes dimeres Intermediat und als zentrales Zwischenprodukt der Benzylisochinolinsynthese postuliert worden war, eine weitere Bestätigung, als Battersby erstmals radioaktiv markiertes Norlauidanosolin synthetisierte und an Kapseln von Papaver somniferum applizierte (BATTERSBY und

BINKS, 1960; BATTERSBY et al., 1964): Es wurde gezeigt, daß racemisches Norlaudanosolin in die Opiumalkaloide Thebain, Codein und Morphin spezifisch inkorporiert wurde. Etwas später stellte sich dann heraus, daß nur das (S)-Enantiomer von Norlaudanosolin die richtige Stereokonfiguration für eine Metabolisierung zu den Morphinalkaloiden besitzt (BATTERSBY et al., 1965a). In weiteren Fütterungsexperimenten mit radiomarkiertem Norlaudanosolin konnte dann auch der Einbau in Vertreter anderer Strukturtypen nachgewiesen werden, wie z.B. in das Phthalidisoquinolin Narcotin in Papaver somniferum (BATTERSBY und McCALDIN, 1962), in das Bisbenzylisoquinolin Thalicarpin in Cocculus laurifolius (SHAKUNI und JAIN, 1982) und in die 1-Benzylisoquinoline Retikulin in Litsea glutinosa (SHAKUNI et al., 1977) und Papaverin (BATTERSBY, 1961) in Papaver somniferum. Daher wurde Norlaudanosolin als die universelle Vorstufe fast aller Benzylisoquinolinklassen angesehen, was in Abbildung 3 anschaulich dargestellt ist (HASLAM, 1986).

Die Versuche mit radioaktiv markierten Vorstufen wie ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -Norlaudanosolin hatten zwar deutliche Übereinstimmungen mit den Hypothesen gezeigt, die 50 Jahre zuvor gemacht worden waren, doch blieben noch eine Reihe von Fragen offen. So veranlaßte der völlig unterschiedliche Einbau von radioaktiv markiertem Dopamin und Tyrosin einige Forschergruppen, die Hypothese von HAHN und STIEHL (1936) wiederaufzugreifen. Letztere hatten für die Kondensationsreaktion zu den Benzyltetrahydroisoquinolinen statt des Aldehyds eine α -Ketosäure als einen der beiden Reaktionspartner formuliert, da diese mit dem Phenylethylamin wesentlich schneller reagiert. Insbesondere sollte dies dann gelten, wenn hydroxylierte Phenylacetaldehyde verwendet werden, die wegen verstärkter Nebenreaktionen die Reaktionsgeschwindigkeit der Kondensation zusätzlich verlangsamen.

An dieser Hypothese war in der Folgezeit viel Kritik geübt worden. Vor allem wurde Hahn und Stiehl vorgeworfen, durch die Verwendung unphysiologisch hoher Phenylacetaldehydkon-

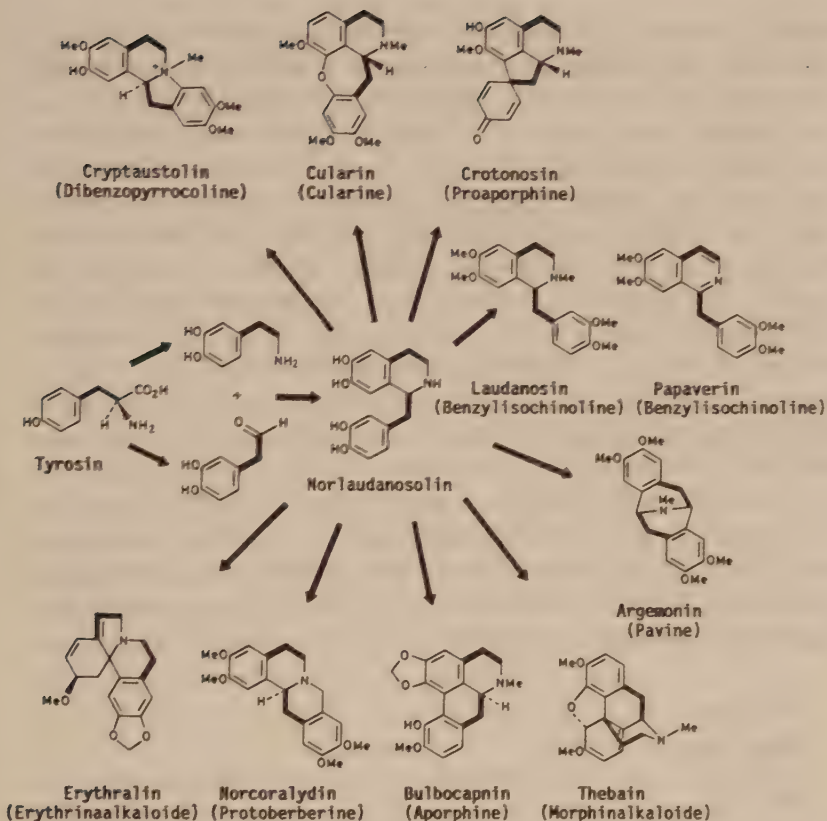


Abb. 3 Einbau von Norlaudanosolin in Vertreter verschiedener Isochinolinstrukturen (Original aus HASLAM, 1986).

zentrationen wäre eine starke Polymerisation der Aldehyde eingetreten und die Bildung von Benzyltetrahydroisochinolinen verhindert worden (SCHÖPF und SALZER, 1940). Dennoch

konnte vorerst nicht geklärt werden, ob nicht doch eine α -Ketosaure der Kondensationspartner des Amins und damit ein 1-Carboxy-Isochinolin das Kondensationsprodukt waren.

Um die Hahn'sche Hypothese in vivo zu überprüfen, applizierten WILSON und COSCIA (1975) 1- ^{14}C , 2- ^3H -Dopa an Keimlinge und Latex von Papaver orientale und isolierten radiomarkiertes 1-Carboxynorlaudanosolin (0,07 % Einbau bei Applikation an Keimlinge, 4,1 % Einbau bei Inkubation mit Latex), das in vivo zu Norlaudanosolin decarboxyliert werden konnte. Zusätzlich glaubten sie nach Applikation von 2- ^{14}C -Dopa das Auftreten von 1,2-Dehydronorlaudanosolin nachgewiesen zu haben. Sie nahmen an, daß aus markiertem Dopa durch Transaminierung das entsprechende Phenylpyruvat entstanden war. Das durch Kondensation gebildete 1-Carboxynorlaudanosolin sollte dann - möglicherweise über 1,2-Dehydronorlaudanosolin als Zwischenstufe - zu Norlaudanosolin decarboxyliert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Applikationsexperimente mit 3- ^{14}C -Norlaudanosolin-1-carbonsäure an Kapseln von Papaver somniferum, bei denen diese Aminosäure zu 0,07% in

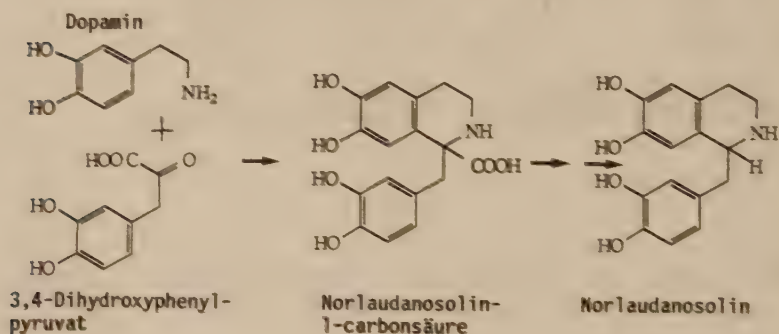


Abb. 4 Kondensation von Dopamin mit 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat zu Norlaudanosolin-1-Carbonsäure und anschließende Decarboxylierung zu Norlaudanosolin nach der Hypothese von HAHN und STIEHL (1936) und Versuchen von WILSON und COSCIA (1975), SCOTT et al. (1978) und BATTERSBY et al. (1975).

Morphin eingebaut wurde (BATTERSBY et al., 1975). Auch wurde bei in vitro Versuchen mit Rohextrakten von Papaver somniferum 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat angeblich zu 1-Carboxynorlaudanosolin, 1,2-Dehydronorlaudanosolin und Norlaudanosolin umgewandelt (SCOTT et al., 1978).

Im Widerspruch dazu stehen die Applikationsexperimente mit ^{14}C -Dopa, die u.a. an Hydrastis canadensis und verschiedenen Corydalis-Arten durchgeführt wurden. Holland und seine Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, daß Dopa wie Dopamin nur in die Isochinolinhälfte der Benzylisochinoline Hydrastin, Corydalin, Protopin und Ochotensimin eingebaut wird (HOLLAND et al., 1979). Dies bedeutet, daß das aus Tyrosin entstandene Dopa weder zum Phenylpyruvat noch zum Phenylacetaldehyd umgewandelt, sondern ausschließlich zu Dopamin decarboxyliert wird.

Um eindeutige Aussagen über die Abfolge und Mechanismen biosynthetischer Vorgänge in der Pflanze machen zu können, reichen die Ergebnisse von Applikationsexperimenten mit radiomarkierten potentiellen Vorstufen nicht aus, da hier weder die Kompartimentierung in der Zelle noch das Vorhandensein endogener Poolgrößen berücksichtigt werden. Dies soll durch folgendes Beispiel verdeutlicht werden: Kommt eine Substanz wie Dopamin in größeren Mengen endogen vor, und wird sie dann von außen markiert zugeführt, hat dies eine sehr starke Verdünnung der markierten Vorstufe und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge. Deswegen lassen sich die exakte Hintereinanderschaltung der Biosyntheseschritte und die Identifizierung der dabei entstehenden Produkte nur durch die Auffindung und Charakterisierung der dazugehörigen Enzyme nachweisen.

Bei den Benzylisochinolininen gelang der Durchbruch mit der Reinigung und Charakterisierung der (S)-Norlaudanosolin-Synthase (RÜFFER et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1983; 1; die Nummerierung bezieht sich auf Abb. 5), die die Kondensation von Dopamin mit 3,4-Dihydroxy-, 4-Hydroxyphenylacetaldehyd

bzw. Phenylacetaldehyd katalysiert. Damit wurde auch die Hahn'sche Hypothese (HAHN und STIEHL, 1936) widerlegt, da substituiertes und nicht substituiertes Phenylpyruvat vom Enzym als Substrate nicht akzeptiert werden. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, daß Dopamin mit dem jeweiligen Aldehyd oder Phenylpyruvat auch ohne Enzymzusatz reagiert, was die Ergebnisse von WILSON und COSCIA (1975) und Scott (SCOTT et al., 1978) erklären würde.

Auch die weiteren enzymatischen Schritte sind untersucht und weitgehend geklärt: In drei aufeinanderfolgenden Methylierungen wird Norlaudanosolin zum Retikulin umgesetzt. Katalysiert werden diese Reaktionen durch die SAM:Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase (RÜFFER et al., 1983; 2), die stereoselektive SAM:(S)-6-O-Methylnorlaudanosolin-4'-O-Methyltransferase (FRENZEL, 1987; 3) und durch die SAM:Norretikulin-N-Methyltransferase (WAT et al., 1986; FRENZEL, 1987; 4). Ob jedoch die Methylierung an der 4'-O-Stellung tatsächlich vor der N-Methylierung abläuft, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

Die bisherige Vorstellung des Biosyntheseweges zum Retikulin, dem zentralen Intermediat des Isochinolinstoffwechsels, ist in Abbildung 5 aufgezeigt, in der auch auf die Vorstufen von Dopamin, 3,4-Dihydroxy- und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd eingegangen wird. Die Enzyme, die diese ersten Schritte katalysieren, wurden ebenfalls gereinigt und charakterisiert (RÜFFER und ZENK, 1987). Vergleicht man jedoch die Fütterungsexperimente an Berberis canadensis (RÜFFER und ZENK, 1987) mit denjenigen an Berberis stolonifera (STADLER, 1986), ergeben sich gewisse Widersprüche: Wurde im ersten Fall ein - wenn auch geringer - Einbau von Tyramin in die Benzylhälfte des Protoberberins Jatrorrhizin gefunden, konnte in den Bisbenzylisochinolininen aus Berberis stolonifera keine Radiomarkierung im unteren Fragment festgestellt werden. Möglicherweise ist diese Diskrepanz einer zu schwachen Aminoxidaseaktivität im Berberis stolonifera Gewebe zuzuschreiben, so daß Tyramin nicht in den entsprechenden

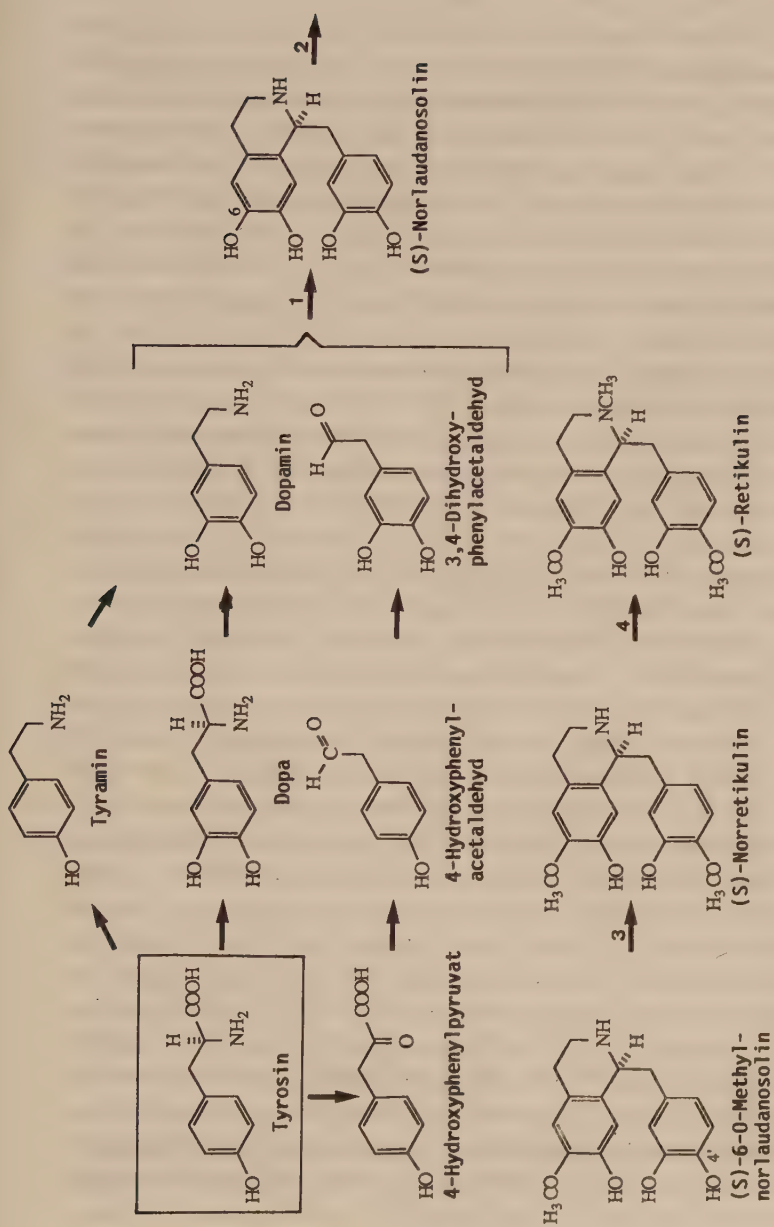


Abb. 5 Bisher postulierter Biosyntheseweg von Tyrosin zu (S)-Retikulin. Die Zahlen stehen für die im Text genannten Enzyme.

Aldehyd überführt worden ist.

Das durch Kondensation von Dopamin mit 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd und drei nachfolgende Methylierungen entstandene Retikulin stellt - wie es auch von Norlaudanosolin angenommen wird - eine wichtige Schlüsselverbindung in der Benzylisochinolinbiosynthese dar. Zahlreiche Applikationsversuche zeigten, daß es in verschiedene Strukturtypen wie z.B. in das Protoberberin Berberin (BARTON et al., 1963), in das Benzophenanthridin Chelidonin (BATTERSBY et al., 1965b), in Protopin (BARTON et al., 1965a), in das Phthalidisochinolin Narcotin (BATTERSBY und HIRST, 1965) und in die Opiumalkaloide Thebain, Codein und Morphin (BATTERSBY et al., 1965a) eingebaut wird. Dabei ist die Stereokonfiguration am chiralen C-1-Atom von entscheidender Bedeutung. So wurde z.B. bei der Applikation von (R)- und (S)-Retikulin, die am C-1-Atom eine Tritiummarkierung und an drei weiteren C-Atomen eine ^{14}C -Markierung besaßen, an Papaver somniferum festgestellt, daß beide Enantiomere in Thebain, Codein und Morphin inkorporiert werden (BATTERSBY et al., 1965a). Dabei betrug bei der Metabolisierung des (S)-Enantiomers der Tritiumverlust in C-1-Stellung 80 - 90 %, während bei Fütterungsversuchen mit dem (R)-Enantiomer bis zu 60 % der ursprünglichen Tritiummarkierung wiedergefunden wurden. Battersby und seine Mitarbeiter schlossen daraus, daß (S)-Retikulin über 1,2-Dehydroretikulin als Zwischenstufe in einem Oxidations-Reduktionsgleichgewicht in (R)-Retikulin überführt wird. Dieses Enantiomer besitzt die mit Morphin übereinstimmende Konfiguration am C-1-Atom und wird als die eigentliche Vorstufe der Morphinalkaloide angesehen. Ungeklärt blieb allerdings die Frage, warum bei der Metabolisierung von (R)-Retikulin ebenfalls ein Tritiumverlust festgestellt worden war, obwohl es ja bereits die "geeignete" Konfiguration für eine Metabolisierung zu den Morphinalkaloiden besitzt.

In der Folge konnte nachgewiesen werden, daß 1,2-Dehydroretikulin tatsächlich als Intermediat in der Morphinbiosynthese auftritt. So wurde einerseits radiomarkiertes 1,2-Dehy-

droretikulin in Thebain, Codein und Morphin inkorporiert, andererseits ließ es sich durch Isotopenverdünnungsanalysen in Papaver somniferum nachweisen (BORKOWSKI et al., 1978). Auch Untersuchungen auf enzymatischem Niveau scheinen Teile der von Battersby entwickelten Hypothese zu bestätigen. So wurde aus Zellkulturen von Berberis wilsoniae ein Enzym isoliert und charakterisiert, das (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin in die entsprechenden 1,2-Dehydroverbindungen überführt (AMANN, 1986). Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase (STOX) neben (S)-1-Benzylisochinolininen auch (S)-Tetrahydroprotoberberine umsetzt - also nicht ausgeprägt substratspezifisch ist. Ferner wäre es bei einem von STOX katalysiertem Reaktionsmechanismus nicht erklärbar, warum bei der Metabolisierung zu den Morphinalkaloiden 10 - 20% der Tritiummarkierung an der C-1-Position von (S)-Retikulin erhalten bleiben (vgl. BATTERSBY et al., 1965a). Auf das Enzym, das 1,2-Dehydroretikulin stereospezifisch zu (R)-Retikulin umsetzt, konnten bisher noch keine Hinweise erhalten werden.

Über die weiteren Biosyntheseschritte von (R)-Retikulin zu Morphin können ebenfalls nur aufgrund der Ergebnisse von Applikationsexperimenten Aussagen gemacht werden. So scheint es sicher, daß die Morphinalkaloide in der Reihenfolge (R)-Retikulin - Thebain - Codein - Morphin gebildet werden (KLEINSCHMIDT, 1960; STERMITZ und RAPOPORT, 1961). Der Übergang von (R)-Retikulin zu Thebain, der bereits 1957 von BARTON und COHEN diskutiert wurde, muß über eine durch Phenoxidation entstehende Verbindung mit Dienonstruktur verlaufen. Diese Verbindung wurde 1964 von Barnes erstmals aus Croton salutaris isoliert und Salutaridin benannt (vgl. BARTON et al., 1965b). Fast zur gleichen Zeit gelang es Barton und seinen Mitarbeitern, diese Verbindung zu synthetisieren und den Einbau von Salutaridin in Thebain, Codein und Morphin nachzuweisen (BARTON et al., 1965b). Außerdem wurde durch Isotopenverdünnungsanalysen gezeigt, daß Saluta-

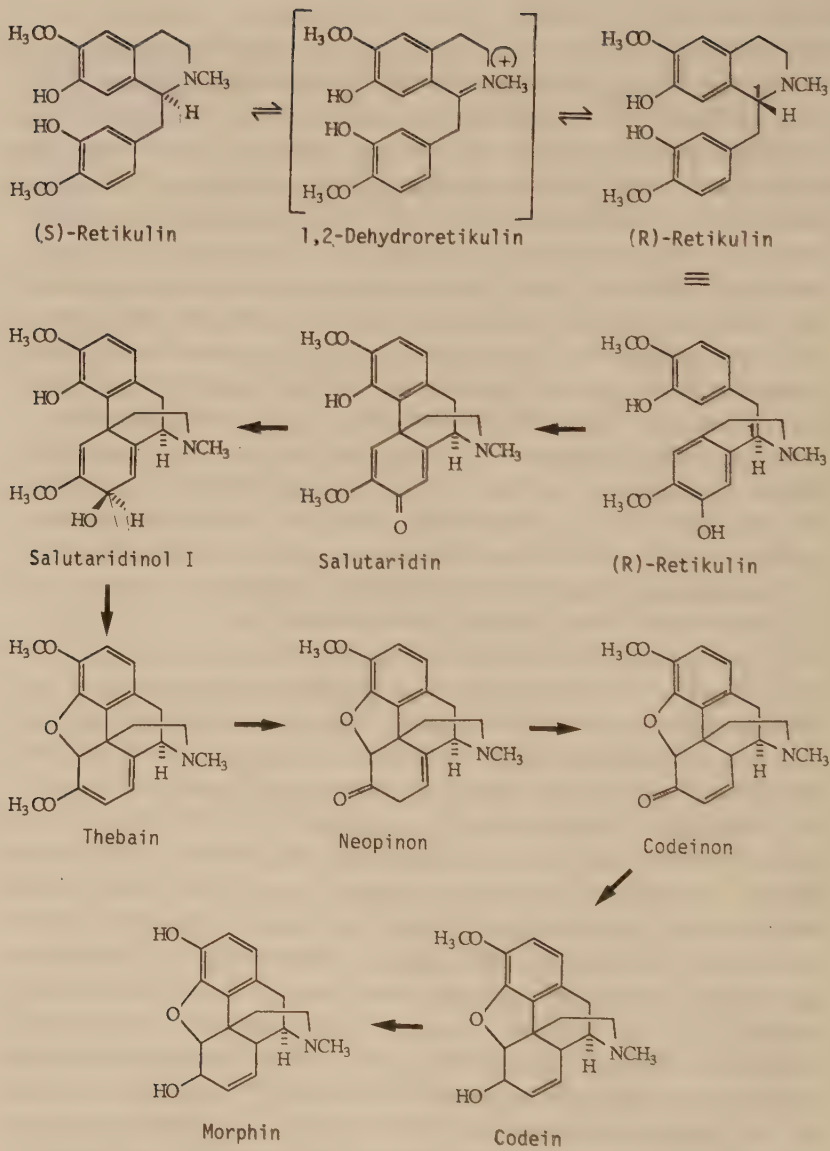


Abb. 6 Biosynthese des Morphins, verändert nach CORDELL (1981).

ridin in Papaver somniferum natürlich vorkommt.

Die durch die in vitro Reduktion von Salutaridin mit Natriumborhydrid entstehenden epimeren Alkohole Salutaridinol I und II wurden ebenfalls an Papaver somniferum appliziert. Es zeigte sich jedoch, daß nur Salutaridinol I die richtige Stereokonfiguration für eine Metabolisierung zu Thebain, Codein und Morphin besitzt (BARTON et al., 1965b).

Die weitere Metabolisierung von Thebain zu Codein verläuft - wie Fütterungsversuche gezeigt haben - über die Zwischenstufen Neopinon und Codeinon. Diese Verbindungen konnten durch Isotopen-Verdünnungsanalysen in Papaver somniferum als Intermediate nachgewiesen werden (BATTERSBY et al., 1967; PARKER et al., 1972). Das durch Reduktion von Codeinon entstehende Codein kann nach O-Demethylierung weiter zu Morphin umgewandelt werden. Ein Schema der Morphinbiosynthese, das auf den hier genannten Fütterungsversuchen basiert, ist in Abbildung 6 dargestellt.

Neben dem eben beschriebenen Biosyntheseweg von Thebain zu Morphin über Neopinon, Codeinon und Codein existiert eine alternative Sequenz für die letzten Schritte der Morphinbiosynthese. BROCHMANN-HANSEN (1984) zeigte mit Hilfe von Applikationsexperimenten, daß Morphin ausgehend von Thebain auch über die Zwischenstufen Oripavin und Morphinon gebildet werden kann. Oripavin, das aus Thebain durch Demethylierung in der 3-O-Position entsteht, wurde in Morphinon und Morphin spezifisch inkorporiert, während in Thebain keine Markierung festzustellen war. Ferner konnte das Vorkommen von Oripavin in Papaver somniferum nachgewiesen werden (NIELSEN et al., 1983). Über welchen der beiden Biosynthesewege Morphin hauptsächlich gebildet wird, hängt wahrscheinlich von den relativen Aktivitäten der Enzyme ab, die die Umsetzung von Thebain zu Neopinon bzw. Oripavin katalysieren (BROCHMANN-HANSEN, 1985).

Über die Enzymsysteme, die die Biosyntheseschritte von (R)-Retikulin zu Morphin im pflanzlichen Gewebe katalysieren, ist bis jetzt nur wenig bekannt. Zwar haben HODGES und

RAPOPORT (1982) die Konversion von (R)-Retikulin zu Salutaridin in Rohextrakten von Papaver somniferum beschrieben, doch war es anderen Arbeitsgruppen nicht möglich, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Nur der Nachweis der enzymatisch katalysierten Reduktion von Codeinon zu Codein scheint gesichert, nachdem die Reduktaseaktivität in zellfreien Rohextrakten von Kalli (FURUYA et al., 1978) und Ganzpflanzen (HODGES und RAPOPORT, 1980) von Papaver somniferum nachgewiesen werden konnte. Um eindeutige Aussagen über den Ablauf der Morphinbiosynthese machen zu können, wäre es aber aus den bereits genannten Gründen unerlässlich, alle Enzymsysteme zu isolieren und zu charakterisieren, die die Schritte zwischen (R)-Retikulin und Morphin katalysieren.

Die Ergebnisse der Fütterungsexperimente mit radiomarkierten potentiellen Vorstufen und der enzymatischen Untersuchungen hatten im großen und ganzen deutliche Übereinstimmungen mit den Hypothesen von Winterstein und Trier und Robinson gezeigt. Ungeklärt blieb allerdings weiterhin, warum bei Applikationsexperimenten Dopa und Dopamin nur in die Isocholinlhälfte und nicht wie Tyrosin auch in die Benzylhälfte der Benzylisochinolinalkaloide inkorporiert wurden (vgl. Abb. 2). Wenn es sich bei Norlaudanolin tatsächlich um die universelle Vorstufe der Benzylisochinoline handelt, hätte der Einbau von Dopa und Dopamin in die Benzylhälfte erfolgen müssen.

Ein erster Hinweis, in welcher Richtung eine Antwort auf diese Frage gesucht werden mußte, wurde erhalten, als bei Applikationsversuchen an Berberis stolonifera Zellkulturen ein erheblicher Einbau von radiomarkiertem (S)-Coclaurin und (S)-N-Methylcoclaurin in das Protoberberin Jatrorrhizin beobachtet wurde (STADLER, 1986). Coclaurin, N-Methylcoclaurin und deren biosynthetische Vorstufe Norcoclaurin (PRAKASH et al., 1979) waren nämlich bis zu dieser Entdeckung ausschließlich als Vorläufer von Benzylisochinolinstrukturen, die in der Benzylhälfte nur eine Hydroxylgruppe in 4'-

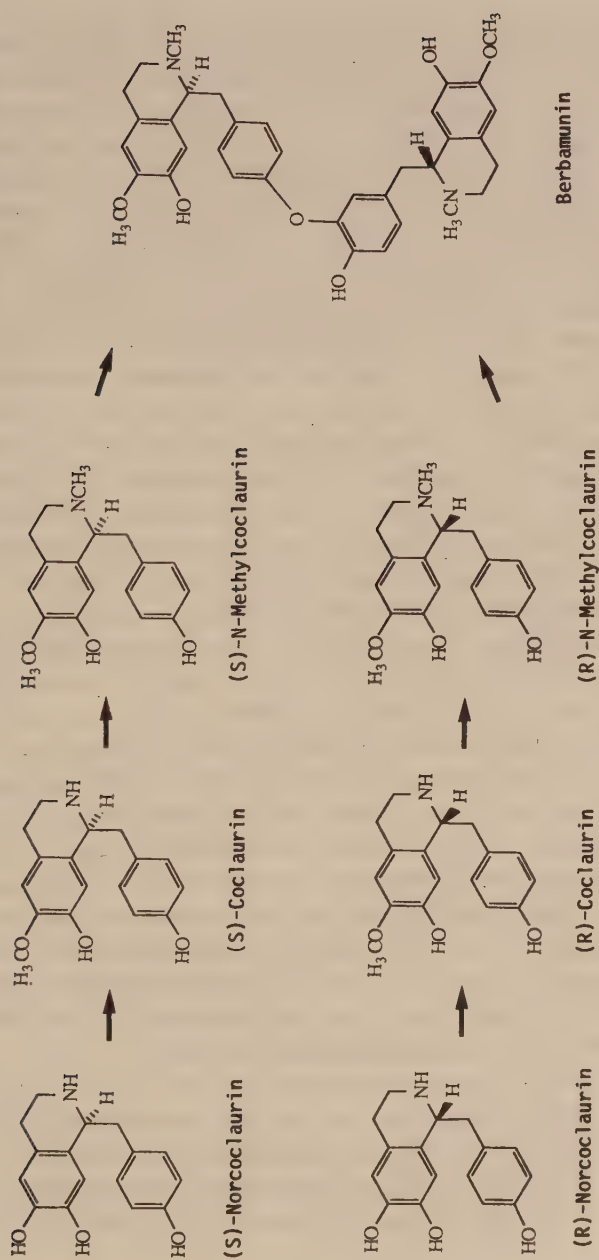


Abb. 7 Potentieller Biosyntheseweg zum Bisbenzylisoquinolinalkaloid Berbaminin aus Berberis stolonifera Zellkulturen (nach STADLER, 1986).

Stellung aufweisen, bekannt gewesen, wie z.B. der Bisbenzylisochinoline Epistephanin (BARTON et al., 1966b), Oxyacanthin (BHAKUNI et al., 1978a), Tiliacarin und Tiliacarinin (BHAKUNI et al., 1978b), Berbamunin und Aromolin (vgl. Abb. 7; STADLER, 1986), der Propaporphine N-Methylcrotosparin (BHAKUNI und JAIN, 1981), Mecambrin (BARTON et al., 1966a), Crotonosin (HAYNES et al., 1965; BARTON et al., 1967), Pronuciferin und Stepcharin (BHAKUNI et al., 1983a) und der Aporphine Roemerin und Anonain (BARTON et al., 1966a). Mit dem Einbau eines im C-Ring monohydroxylierten Benzylisochinolins in ein Protoberberin war nun der Nachweis erbracht, daß (S)-Cocclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin auch in eine Benzylisochinolinklasse inkorporiert werden, die in der Benzylhälfte zweifach hydroxyliert ist und von der bisher angenommen wurde, daß sie sich von Norlaudanosolin ableitet. Daraus folgt, daß Norcocclaurin, Cocclaurin und N-Methylcocclaurin Vorstufen von Retikulin und aller von Retikulin abgeleiteter Benzylisochinolinalkaloide sein müssen.

Diese Schlußfolgerung bietet auch die Erklärung für das weiter oben gestellte Problem: In Norcocclaurin, das in der Benzylhälfte nur in der 4'-Position hydroxyliert ist, können nämlich Dopa und Dopamin aus strukturellen Gründen nur in die Isochinolinhälfte eingebaut werden. Betrachtet man Norcocclaurin als die Vorstufe aller von Retikulin abgeleiteter Benzylisochinoline, ist ein Einbau von Dopa bzw. Dopamin in die Benzylhälfte dieser Isochinolinstrukturen also überhaupt nicht möglich. Wäre Norlaudanosolin die universelle Vorstufe, hätte dagegen ein entsprechender Einbau beobachtet werden müssen. Da dies aber nicht der Fall war, kann postuliert werden, daß Norcocclaurin und nicht Norlaudanosolin das erste Benzylisochinolin in der Biosynthesekette ist.

Ausgehend von dieser Hypothese stellt sich in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, die Rolle von Norcocclaurin als universelle Vorstufe der Benzylisochinoline zu beweisen. Zu diesem Zweck soll mit Hilfe von Applikationsexperimenten gezeigt werden, daß Norcocclaurin, Cocclaurin und N-Methylcoc-

laurin nicht nur in die Protoberberine, sondern auch in andere Benzylisochinolinstrukturen wie z.B. in das Hydrophe-
nanthrengerüst eingebaut werden können. Ferner sollen in
benzylisochinolinhaltigen Pflanzen und Zellkulturen die
Enzyme nachgewiesen und ggf. gereinigt und charakterisiert
werden, die die Biosynthese von Norcoclaurin über Coclaurin
zu Retikulin auf dem neu zu postulierenden Biosyntheseweg
katalysieren. Außerdem soll mit Hilfe radioimmunologischer
Methoden versucht werden, Coclaurin als Intermediat der
Benzylisochinolinbiosynthese nachzuweisen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

Die pflanzlichen Zellkulturen stammten alle bis auf Kalli und Suspensionskulturen von Tinospora cordifolia, die freundlicherweise von der Firma Nattermann (Köln) zur Verfügung gestellt worden waren, aus der Sammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München. Für die Anzucht wurden folgende Medien verwendet:

1. B5C2-Medium nach GAMBORG et al. (1968) für Tinospora cordifolia-Zellkulturen
2. LS - Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) für Berberis stolonifera - und Papaver somniferum - Zellkulturen.

Suspensionskulturen wurden in 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium oder in 1,5-Liter-Fernbachkolben mit 1 Liter Medium bei 24°C im Dauerlicht (650 lux) auf Rotationsschüttlern mit 100 Upm kultiviert. Nach genau 7 Tagen wurde das Gewebe mit frischem Medium überimpft oder nach Vakuumfiltration mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

Die Anzucht von Kalluskulturen erfolgte in Petrischalen auf mit 1% Agar verfestigtem Medium.

Die untersuchten Ganzpflanzen wurden in Frühbeeten und Gewächshäusern des Instituts für Pharmazeutische Biologie kultiviert. Sie waren aus Samenmaterial angezogen worden, das von verschiedenen botanischen Gärten zur Verfügung gestellt worden war. Die Keimung von Papaver somniferum-Samen erfolgte in durchsichtigen Plastikschaalen ($\varnothing$ 9 cm, Höhe 5 cm) bei 20°C, 83% Luftfeuchtigkeit (Innenraum) und 12-stündiger künstlicher Belichtung mit 2000 lux. Dazu wurden täglich ungefähr 0,2 g gewaschene Samen auf 4 g durchfeuchtetes Vermiculite ausgesät.

Für die Anzucht der Pflanzen sei unseren Gärtnern Frau H. Hirschmann und Herrn F. Meyer herzlich gedankt.

2. Spezielle Chemikalien

Bio-Rad: Hydroxylapatit

Boehringer: Katalase (Nr. 106810)

Fluka: L-Adrenalin, N-Hydroxymaleinimid, Synephrintartrat

LKB: Ampholine (pH 4,0 - 6,5), TSK-G 3000SW Ultropac

Merck: Isovanillin, TSK-HW 55S

Pharmacia: DEAE-Sephacel, epoxyaktivierte Sepharose 6B, Mono Q, Phenylsepharose, Q Sepharose Fast Flow, Sephadex G 25, G 100 und G 200

Sartorius: Celluloseacetatmembranen (16 cm x 16 cm; Porengröße 0,45 μm)

Serva: Acrylamid, Bisacrylamid, BSA, Controlled pore glass (CPG-10), Elektrodenlösung für isoelektrische Fokussierung (pH 3 und pH 7), Natriumdodecylsulfat, Ponceau S, XAD-2

Sigma: Aktivkohle, Catechol-O-Methyltransferase (Nr. 4512), Dextran, Diethyldithiocarbamat, EDC, Tyrosinase (Nr. 7755), Tyrosindecaboxylase (Nr. 4629)

Amersham Buchler: 8- ^{14}C -Dopamin, 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin, 7- ^{14}C -Tyramin, 2,6- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin

Radioaktiv markiertes C^3H_3 - und $^{14}\text{CH}_3$ -SAM sowie (R)- und (S)-6-O $^{14}\text{CH}_3$ -Norretikulin wurden mir von Herrn Dr. T. Frenzel, 7- ^3H -Salutaridinol I und II und 8- ^{13}C -Tyramin von Herrn Dr. S. Jendrzewski, (R,S)-1- ^{13}C -Norcoclaurin, (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin, (R)- und (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin, (R)- und (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulin von Herrn R. Stadler (alle Institut für Pharmazeutische Biologie, München) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Herr Prof. H.-L. Schmidt (Weihenstephan) überließ mir L-2- ^{13}C -Tyrosin, und Herr Prof. N. Nagakura synthetisierte (S)-N $^{13}\text{CH}_3$ -Retikulin, (R)- und (S)-Coclaurin, (R)- und (S)-Coclaurin-N-Propionsäure und (R)- und (S)-Norcoclaurin, wofür ich beiden zu großem Dank verpflichtet bin. (R)- und (S)-N $^{14}\text{CH}_3$ -Retikulin und die meisten Referenzalkaloide stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls.

3. Geräte

pH-Messung: Digi 610 (WTW)

Zentrifugation: Sorvall RC 58 (Rotoren SS 34, GSA, GS-3),
Tischzentrifuge 5412 (Eppendorf)

Radioimmunttest: Multivortexmischer und Cryofuge 6-6 (Heraeus), Tischrechner Apple IIe

Elektrophorese: Flachbettelektrophoresekammer Multiphor 2117 (LKB) mit Thermostat Haake F3, Macrodrive 5 Power Supply (LKB), Slab Gel Drier 2003 (LKB)

FPLC: 2 Pumpen P-500, Pumpe P-1, Gradientenmischer, Motorventil MV-7, Superloop 50 ml, Photometer UV-1, Fraktionssammler Frac-100, Controller LLC 500 (Pharmacia)

HPLC: 2 Pumpen 510, Autosampler WISP 710 B, Photometer Lambda-Max 481, Automated Gradient Programmer, Integrator Data Module 740 (Waters-Millipore)

GPC: Pumpe 2150, Rheodyne-Ventil 7125, Photometer Uvicord 2158 SD, Potentiometric Recorder 2210 (LKB), Fraktionskollektor Gilson 201

Chromatographiesystem für Enzymreinigungen: Fraktionssammler Ultrarac 7000, UV-Detektor Uvicord III, Pumpe Mikroperpex, CombiCold Rac (LKB)

Elektrodialyse: Biotrap (Schleicher & Schuell)

4. Synthesen

4.1 Synthese von Natrium-N-Hydroxysulfosuccinimid

Nach der Vorschrift von STAROS (1982) wurde in eine Lösung von 1 g N-Hydroxymaleinimid in 3,5 ml absolutem Ethanol Stickstoff eingeleitet und unter ständigem Rühren 2 ml einer wässrigen Lösung von 0,84 g Natriumdisulfit zugetropft. Nach zwei Stunden Rühren unter Stickstoff wurde die Mischung belüftet. Beim Einengen des Reaktionsansatzes im Vakuum

(40°C) konnte ein zähflüssiges gelbes Öl erhalten werden, welches nach Lösen in 35 ml Wasser gefriergetrocknet wurde. Das Lyophilisat wurde mit wasserfreiem Ether verrieben und das Produkt, ein hellgelbes Pulver abfiltriert. Die dünn-schichtchromatographische Überprüfung in LM 1 (s. II.12) zeigte die vollständige Umsetzung zum Succinimid.

Ausbeute: 1,61 g (84%)

MS (EI): Die Erstellung eines Massenspektrums war nicht möglich, da die Substanz aufgrund ihres Salzcharakters nicht verdampfte.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO): 2,63 - 2,93 ppm (2 dd, 2 H), 3,73 - 3,76 ppm (dd, 1 H, H-Atom α -ständig zu SO_3^-)

4.2 Synthese von 4-Hydroxy- und 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd

A. Synthese von 4-Hydroxyphenylacetaldehyd

Nach der Vorschrift von FELLMAN (1958) wurden 0,53 g Syne-phrintartrat in 3 ml 85%iger Phosphorsäure 20 sec lang auf 120°C erhitzt und anschließend in 15 ml eisgekühltes Wasser gegossen. Diese Mischung wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen im Vakuum (40°C) wurde ein hellgelbes Öl erhalten, welches auf 1,5-mm-Dickschichtplatten (Kieselgel 60 GF₂₅₄, selbstgestrichen) in LM 2 (s. II.12) chromatographiert wurde. Die Platten wurden abgedeckt und ein Ende mit diazotierter Sulfanilsäure in 10%iger Natriumcarbonatlösung besprüht, wobei sich der Aldehyd orange färbte (R_f -Wert 0,74). Die entsprechende Zone wurde mit Methanol eluiert und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Ausbeute: 28 mg (12%)

Zum Identitätsnachweis wurde der Aldehyd mit Natriumborhydrid in Methanol reduziert. Nach Reinigung in LM 3 (s. II.12) wurde ein MS erstellt, welches die Struktur des 4-Hydroxyphenylalkohols bestätigte.

MS (EI): $M^+ = 138$ (16%), $m/z = 107$ (100%), $m/z = 77$ (27%)

B. Synthese von 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd

Die Synthese und Reinigung wurde wie unter A. beschrieben mit L-Adrenalin durchgeführt (R_f -Wert in LM 2: 0,48).

Ausbeute: 11 mg (3%)

4.3 Darstellung von (R)- und (S)-6-OC³H₃-Cocclaurin und (R)- und (S)-6-O¹⁴CH₃-Cocclaurin

Radioaktiv markiertes (R)- und (S)-Cocclaurin wurde mit Hilfe von käuflicher Catechol-O-Methyltransferase und von C³H₃- bzw. ¹⁴CH₃-SAM als Cosubstrat dargestellt. Die spezifischen Aktivitäten der COMT gegenüber (R)- und (S)-Norcocclaurin ließen sich im Standardtest bestimmen (s.II.6.2). Dabei fiel auf, daß das (S)-Enantiomer fast doppelt so gut umgesetzt wurde wie (R)-Norcocclaurin. Außerdem methylierte das Enzym (S)-Norcocclaurin ausschließlich in der 6-O-Stellung zu (S)-Cocclaurin, während aus (R)-Norcocclaurin Isococclaurin, Cocclaurin und etwas Norarmepavin (<3%) entstanden. Der Anteil an gebildetem Isococclaurin erwies sich abhängig von der Inkubationsdauer und zugesetzter Enzymmenge. Um einen Mittelweg zwischen möglichst vollständigem Enzymsatz und niedrigem Isococclaurinanteil zu finden, wurde bei der Darstellung von (R)-6-O¹⁴CH₃-Cocclaurin der Ansatz zuerst 12 h mit einer Enzymmenge von 6,0 pkat und nach Zugabe von weiteren 4,1 pkat nochmals 4 h inkubiert. Die Ausbeute an methylierten Produkten betrug hierbei 33%, wovon ungefähr zwei Drittel auf entstandenes Isococclaurin entfielen. Die Synthese von tritiummarkiertem (R)-Cocclaurin mußte nicht mit zweimaligen Enzymzusatz durchgeführt werden, da die bei diesem Ansatz eingesetzten Substratmengen um zwei Zehnerpotenzen niedriger lagen.

In Tabelle 1 sind die einzelnen Inkubationsansätze aufgeführt, wobei jedem 0,25 mmol Natriumascorbat, 0,25 mmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 0,6 µmol Magnesiumchlorid zugesetzt sind.

Nach beendeter Reaktion, welche in bestimmten Zeitabständen

	1	2	3	4
(S)-Norcoclaurin	50 nmol	- - - -	1 mmol	- - - -
(R)-Norcoclaurin	- - - -	50 nmol	- - - -	1 mmol
$^{14}\text{CH}_3$ -SAM	- - - -	- - - -	20 μCi = 340 nmol	20 μCi = 340 nmol
C^3H_3 -SAM	80 μCi = 6,7 nmol	80 μCi = 6,7 nmol	- - - -	- - - -
COMT	7,4 pkat	4,1 pkat	7,4 pkat	6,0 pkat + 4,1 pkat
Gesamtvolumen	1 ml	1 ml	4 ml	4 ml
Inkubationsdauer (30°C)	4 h	14 h	12 h	12 h + 4 h
Ausbeute	29 μCi (36%)	11 μCi (7%)	13 μCi (63%)	2 μCi (10%)
errechnete spez. Akt. des Produkts	12 mCi/ μmol	12 mCi/ μmol	59 mCi/nmol	59 mCi/nmol

Tab. 1 Zusammensetzung der Ansätze zur enzymatischen Synthese von (S)- und (R)-6-OC³H₃-Coclaurin (Ansatz 1 und 2) und von (S)- und (R)-6-O¹⁴CH₃-Coclaurin (Ansatz 3 und 4).

durch die Entnahme von Aliquots und deren Untersuchung auf verbliebenes radiomarkiertes SAM verfolgt werden konnte, wurde mit Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 alkalisiert und fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Eine eventuell entstandene Emulsion konnte durch Abzentrifugieren gebrochen werden. Zur Abtrennung von restlichem nicht markiertem Alkaloid wurden die eingeengten Extrakte in LM 4 (s. II.12) chromatographiert. Für die (R)-Cocclaurin-Ansätze mußte zusätzlich LM 5 (s. II.12) benutzt werden, um Cocclaurin von Isococclaurin und Norarmepavin zu reinigen (R_f -Wert Isococclaurin 0,54, Cocclaurin 0,61, Norarmepavin 0,76).

4.4 Darstellung von (R)- und (S)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin

(R)- und (S)-Cocclaurin wurden durch Katalyse einer nicht stereoselektiven N-Methyltransferase, die aus Berberis stolonifera-Suspensionskulturen dreifach angereichert worden war (WAT et al., 1986), zu den jeweiligen N-Methylderivaten umgesetzt. Die Ansätze enthielten in 3,5 ml Gesamtvolumen 1 mmol (R)- oder (S)-Cocclaurin, 20 μ Ci ¹⁴CH₃-SAM (340 nmol), 0,5 mmol Natriumascorbat, 0,5 mmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 87 pkat Enzym. Diese Enzymmenge entsprach 3,1 mg Protein für (R)-Cocclaurin und 3,6 mg für (S)-Cocclaurin. Nach dreistündiger Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze wie unter 4.3 beschrieben aufgearbeitet und in LM 4 (s. II.12) gereinigt. Die Ausbeuten betrugen für (S)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin 75% (15 μ Ci; spez. Aktivität 59 mCi/mmol) und für (R)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin 60% (12 μ Ci; spez. Aktivität 59 mCi/mmol).

4.5 Darstellung von (R,S)-3-¹⁴C-Norcocclaurin und (R,S)-3-¹⁴C-Norlaudanosolin

Bei der Darstellung von radioaktiv markiertem Norcocclaurin und Norlaudanosolin wurde die Tatsache ausgenutzt, daß Dopamin mit entsprechend substituierten Aldehyden ohne jeglichen Enzymzusatz zu den oben genannten 1-Benzylisochinolin

kondensiert (RÜFFER et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1983). In einem Gesamtvolumen von 600 μ l wurden 8- 14 C-Dopamin (5 μ Ci, 100 nmol), 25 μ mol 4-Hydroxy- oder 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, 0,1 mmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 und 0,1 mmol Natriumascorbat über Nacht bei 30°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf zwei Cellulosedünnschichtplatten aufgetragen und in LM 1 chromatographiert (s. II.12; R_f -Wert Dopamin 0,57, Norcocclaurin 0,83, Norlaudanosolin 0,71). Nach Elution und Einengen der markierten Produkte mußte ausreichend mit Stickstoff begast werden, um oxidative Vorgänge während der Lagerung bei -20°C zu verhindern.

Ausbeute: (R,S)-3- 14 C-Norcocclaurin 2 μ Ci (40%); 50 mCi/mmol
 (R,S)-3- 14 C-Norlaudanosolin 0,5 μ Ci (10%);
 50 mCi/mmol

4.6 Darstellung von (R,S)-6-OC 3 H $_3$,9- 14 C-Cocclaurin

Doppeltmarkiertes Cocclaurin wurde in drei Schritten synthetisiert, wobei nach jeder Umsetzung eine Reinigung des entstandenen Produktes erfolgte.

a) 7- 14 C- Tyramin (3,75 μ Ci/68 nmol) und 0,23 mg einer aus Erbsenkeimlingen 800fach angereicherten Diaminoxidase (KENTEN und MANN, 1952) wurden in kaliumphosphatgepufferter Lösung (5 μ mol, pH 7,0) unter Zusatz von 3 mg Katalase bei 30°C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 0,5 ml. Die dünn-schichtchromatographische Untersuchung in LM 3 (s. II.12) ergab, daß nach einer Zeit von 45 min das markierte Tyramin vollständig zu 2- 14 C-p-Hydroxyphenylacetaldehyd umgesetzt worden war. Dieses Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert und unter Stickstoff eingeengt.

b) Die Kondensation von 2,5 μ Ci 2- 14 C-p-Hydroxyphenylacetaldehyd mit 100 nmol Dopamin zu 9- 14 C-Norcocclaurin und die anschließende Reinigung wurden analog 4.5 durchgeführt.

c) 0,63 μ Ci 9- 14 C-Norcocclaurin wurden durch Katalyse von 25 pkat COMT mit 7,6 μ Ci C 3 H $_3$ -SAM (0,6 nmol) als Cosubstrat zu 6-OC 3 H $_3$,9- 14 C-Cocclaurin methyliert (s. 4.3). Nach Reinigung

in LM 4 (s. II.12) wurde das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis mit 1:32 bestimmt. Die Ausbeuten betrugen für ^{14}C 0,12 μCi (3%) und für Tritium 4,12 μCi (54%).

Für die Bereitstellung der Diaminoxidase sei Herrn J. Thumann herzlich gedankt.

4.7 Darstellung von 2,6- $^3\text{H}_2$ -Dopamin

Die Darstellung von 2,6- $^3\text{H}_2$ -Dopamin erfolgte aus 2,6- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin, das zum entsprechenden Tyramin decarboxyliert und in einer zweiten, ebenfalls enzymatischen Reaktion am C-3-Atom des Ringes hydroxyliert wurde (SCHUMACHER, 1981).

Zur Aktivierung der Tyrosindecarboxylase mußten 3 mg (16,7 nkat) des Enzyms in 80 μl 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 im Eisbad 1 h gerührt werden. Zu dieser Mischung wurde eine Lösung von 100 μCi 2,6- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin (1 mCi/ml; 35,9 Ci/mmol) in 70 μl des oben erwähnten Puffers gegeben und weitere 20 min bei 37°C gerührt. Zu diesem Zeitpunkt war die Umsetzung vollständig erfolgt, und es konnten zum Ansatz 0,25 mg Tyrosinase, 0,1 mmol Natriumascorbat und 0,15 mmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,1 hinzugefügt werden. Dabei mußte zugleich mit einer Kapillare 5 min lang vorsichtig Luft eingeleitet werden. Die Reaktion wurde dann durch Einfrieren bei -20°C gestoppt. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf Whatman-Papier Nr. 1 in LM 7 (s. II.12) und anschließender Elution mit destilliertem Wasser. Um einer $^3\text{H}/^1\text{H}$ -Austauschreaktion zwischen 2,6- $^3\text{H}_2$ -Dopamin und Wasser vorzubeugen, muß ^3H -Ring-markiertes Dopamin in möglichst niedriger Konzentration bei +4°C aufbewahrt werden (Hinweis der Firma Amersham).

Ausbeute: 29 μCi 2,6- $^3\text{H}_2$ -Dopamin (29%; 35,9 Ci/mmol)

4.8 Darstellung von 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyramin

Wie unter 4.7 beschrieben, wurden 100 μCi 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin (1 mCi/ml, 1 Ci/mmol) enzymatisch zu 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyramin decarbo-

xyliert. Nach chromatographischer Reinigung konnten 45 μCi 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyramin (45%; 1 Ci/mmol) gewonnen werden.

4.9 Synthese von (R,S)-Isococclaurin

Isococclaurin wurde nach der von Teitel und Brossi modifizierten Bischler-Napieralski Reaktion synthetisiert (TEITEL und BROSSI, 1968). Alle Schritte, die im folgenden stichpunktartig aufgeführt sind, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. S. Jendrzewski durchgeführt, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

- Benzylierung von Isovanillin zu 3-O-Benzyl-4-Methoxybenzaldehyd und anschließende Reduktion zum entsprechenden Alkohol
- Substitution der Hydroxylgruppe durch Umsetzung mit Thionylchlorid
- Umsetzung von 3-O-Benzyl-4-Methoxybenzylchlorid mit Kaliumcyanid und Reduktion zu 3-O-Benzyl-4-Methoxyphenylethylamin
- Darstellung des Hydrochlorids und Debenzylierung zu 3-Hydroxy-4-Methoxyphenylethylaminhydrochlorid
- Kondensation von 4-Hydroxyphenylessigsäure mit 3-Hydroxy-4-Methoxyphenylethylamin zum diphenolischen Amid
- Zyklisierung zu 6-Hydroxy-7-Methoxy-1(4-Hydroxybenzyl)-1,2-dehydroisochinolin mit POCl_3 in Acetonitril
- Katalytische Hydrierung und anschließende Darstellung von Isococclaurinhydrochlorid

Ausbeute: 200 mg Isococclaurinhydrochlorid

MS (CI): $\text{M}+\text{H}^+=286$ (100%), $\text{m/z}=178$ (30%)

5. Herstellung zellfreier Enzympräparationen

5.1 Aufschluß pflanzlicher Zellkulturen

Tiefgefrorenes Zellmaterial wurde in kaltem 0,1 M Kalium-

phosphatpuffer (1 g/2 ml; pH 7,5; Zusatz von 20 mM Mercaptoethanol, wenn im Ergebnisteil nicht anders beschrieben) zu einem homogenen Brei gerührt, durch Mull abgepreßt und 10 min bei 10000 g klar zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen (70% Sättigung oder fraktionierte Fällung), nach 10 minütigem Rühren ein zweites Mal abzentrifugiert und der erhaltene Proteinniederschlag in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 suspendiert. Zur Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen erfolgte im Anschluß eine Gelfiltration an Sephadex G 25.

Zur Herstellung einer Mikrosomenpräparation wurde nach der Vorschrift von DIESPERGER et al. (1974) verfahren: 50 g tiefgefrorenes Gewebe wurden in einem eisgekühlten Mörser 20 min in 100 ml 0,1 M Tricinpuffer pH 7,5 mit 5 mM Thioglykolsäure (375 µl/l) zerrieben. Nach 20minütigem Abzentrifugieren bei 12000 g wurden pro ml Überstand 50 µl einer 1 M Magnesiumchloridlösung unter dauerndem Rühren zugetropft. Erneutes Abzentrifugieren ergab ein Pellet, das mehrmals mit obigem Puffer (Zusatz von 1 M Magnesiumchlorid) gewaschen und zuletzt darin suspendiert wurde (durchschnittlicher Proteingehalt 3 mg/ml).

5.2 Aufschluß differenzierter Pflanzen

Die Pflanzenteile wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe einer Mühle gut zerkleinert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 5.1 beschrieben.

6. Enzymtests

6.1 Norcoclaurinsynthase

Dieser Enzymtest, der analog dem Assay für die (S)-Norlaunosolinsynthase durchgeführt wurde (RÜFFER et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1983) basiert auf der Tatsache, daß bei

der Kondensation von 2,6-³H₂-Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu Norcoclaurin eines der beiden Tritiumatome ins Reaktionsmedium als Wasser abgegeben wird. Bei Zugabe einer Aktivkohlesuspension werden alle organischen Moleküle adsorbiert. Somit kann nach Abzentrifugieren freigesetztes Tritium im Überstand quantifiziert und der molare Umsatz ermittelt werden. Da nur eines der beiden Tritiumatome ausgebaut werden kann, wird die Hälfte der eingesetzten Radioaktivität als 100 % Umsatz gerechnet. Ansätze mit hitzedenaturiertem Protein dienen als Kontrollwerte und geben den nicht enzymatisch katalysierten Umsatz an.

Die Ansätze enthielten:

20 µl	Kaliumphosphatpuffer (20 µmol, pH 7,5)
20 µl	Natriumascorbat (20 µmol)
10 µl	Dopamin (50 nmol)
10 µl	2,6- ³ H ₂ -Dopamin (29000 cpm)
40 µl	4-Hydroxyphenylacetaldehyd (200 nmol)
200 µl	<u>Enzymlösung und/oder Wasser</u>
300 µl	Gesamtvolumen

Inkubationsdauer: 30-60 min

Inkubationstemperatur: 30°C

abstoppen mit: 300 µl Kohlesuspension (10 g Aktivkohle und
250 mg Dextran in 100 ml Wasser)

mischen: 1 min (Eppendorf-System)

abzentrifugieren: 5 min/14000 Upm

messen: 300 µl vom Überstand in 5 ml Szintillatorflüssigkeit

6.2 (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase und (R,S)-Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase

Diese Methyltransferasen katalysieren die Übertragung der Methylgruppe von (S)-Adenosylmethionin auf Norcoclaurin oder Coclaurin. Wird im Test C³H₃-SAM als Cosubstrat eingesetzt, so ist es möglich, das gebildete radioaktiv markierte

Produkt quantitativ zu erfassen, da es im Gegensatz zu geladenem C^3H_3 -SAM im alkalischen Milieu extrahierbar ist.

Die Testansätze enthielten:

50 μ l	Kaliumphosphatpuffer (50 μ mol, pH 7,5)
50 μ l	Natriumascorbat (50 μ mol)
10 μ l	(S)-Coclaurin, (R)- oder (S)-Norcoclaurin (50 nmol)
10 μ l	SAM (20 nmol)
10 μ l	C^3H_3 -SAM (15000 cpm)
120 μ l	Enzymlösung und/oder Wasser
250 μ l	Gesamtvolumen

Inkubationsdauer: 30 min

Inkubationstemperatur: 30°C

abstoppen mit: 200 μ l 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 und
400 μ l Isoamylalkohol

extrahieren: 30 min am Rotationsmischer

abzentrifugieren: 10 sec

messen: 200 μ l der organischen Phase

Im Isoamylalkoholextrakt wurden 90 % der radiomarkierten methylierten Produkte wiedergefunden, was bedeutet, daß die Meßwerte mit dem Faktor 1,11 multipliziert werden mußten. Ansätze ohne Enzym dienten als Kontrollwerte.

Zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Methylierungsprodukten der Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase wurden die Enzymansätze mit Ethylacetat statt Isoamylalkohol extrahiert und ein Aliquot in LM 6 (s. II.12) chromatographiert. Die Auswertung erfolgte durch Integration am Dünnschichtscanner.

6.3 Phenolase

Bei dem Test auf das hydroxylierende Enzym handelte es sich wie bei 6.1 um einen Tritiumausbaute, da eines der beiden Tritiumatome von 3,5- 3H_2 -Tyrosin durch eine Hydroxylgruppe

ersetzt wurde. Die Radioaktivität des wässrigen Reaktionsmediums ließ sich nach Zugabe von Kohlesuspension im Überstand messen.

Die Testansätze enthielten:

50 µl	Kaliumphosphatpuffer (50 µmol, pH 6,0)
30 µl	Natriumascorbat (30 µmol)
10 µl	Tyrosin (10 nmol)
10 µl	3,5- ³ H ₂ -Tyrosin (15000 cpm)
200 µl	Enzymlösung und/oder Wasser
300 µl	Gesamtvolumen

Die Durchführung der Tests und die Berechnung des Umsatzes erfolgte wie unter 6.1 beschrieben.

6.4 Cytochrom c - Reduktase

Das Leitenzym für das endoplasmatische Retikulum wurde nach der Methode von LORD (1983) photometrisch bei 550 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 200 nmol NADH, 10 µmol KCN, 20 nmol oxidiertes Cytochrom c, 20 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 10 µl Enzymlösung (29 µg Protein) aus einer Mikrosomenpräparation. Der Reaktionsverlauf wurde bei 550 nm verfolgt und die Enzymaktivität über den Extinktionskoeffizienten ($2,1 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mmol}$) berechnet.

7. Immunologische Methoden

7.1 Immunisierung von Kaninchen mit (R)- und (S)-Cocclaurin-Konjugaten

Die gefriergetrockneten Konjugate von (R)- und (S)-Cocclaurin wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (1,392 g K₂HPO₄,

0,276 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 8,77 g NaCl ad 1000 ml H_2O) gelöst. Für die Vorimmunisierungen wurden unterschiedliche Mengen an gelöstem Konjugat mit kompletten Freund'schen Adjuvans (Difco) im Verhältnis 1:1 durch Ultraschall emulgiert:

- (R)-Cocclaurin-Konjugat: 0,5 mg
- (S)-Cocclaurin-Konjugat: 0,5 mg, 0,25 mg, 0,125 mg, 0,05 mg, 0,025 mg.

Für die Boosterinjektionen wurde jeweils die doppelte Konjugatmenge ohne Adjuvans appliziert (zw. 0,5 und 1,0 ml). Die Kaninchen, in denen Antikörper erzeugt werden sollten, waren zu Beginn der Immunisierung 12 - 15 Wochen alt. Bei den vier Vorimmunisierungen, die im Abstand von jeweils einer Woche vorgenommen wurden, erfolgte die Injektion von 0,5 ml Emulsion subcutan in die Hinterläufe (2 ml Einwegspritzen; Kanüle Nr. 14, 0,65 x 30 mm). Zwei Wochen nach der letzten Vorimmunisierung und im folgenden alle vier Wochen erhielten die Kaninchen Boosterinjektionen, die intramuskulär gespritzt wurden. 7 und 14 Tage nach jeder Boosterinjektion erfolgte durch Anritzen der Ohrvene eine Blutabnahme. Das aufgefangene Blut wurde 1 h bei Raumtemperatur und weitere 12 h bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde das Serum 10 min bei 10000g abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

Frau E. Galneder und Frau E. Schecklies danke ich herzlich für die Hilfe bei den Immunisierungen und Blutabnahmen.

7.2 Durchführung der Radioimmuntests

Für jeden Radioimmunassay wurden vier verschiedene Ansatz-typen pipettiert:

	UB	B	B ₀	T
Antikörper- verdünnung (ml)	---	0,1	0,1	---
Inkubations- lösung (ml)	0,7	0,7	0,7	0,1
Standard/ Probe (ml)	---	0,1	---	---
Wasser (ml)	0,2	---	0,1	---

UB = unspezifische Bindung; B = Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem Antigen; B₀ = Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen; T = eingesetzte Radioaktivität

Die Inkubationslösung bestand aus 0,1 ml Rinderserumverdünnung (1:6), 0,1 ml markiertem Antigen (6000 cpm) und 0,5 ml Puffer.

Die Ansätze UB, B₀ und B wurden nach Zugabe der Antiserumverdünnung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Ammoniumsulfatlösung und erneuter einstündiger Inkubation konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe ausgefällt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 U_{pm} von freiem Antigen abgetrennt werden. Das Pellet wurde mit 1 ml 52%iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 0,3 ml Wasser aufgenommen und die Radioaktivität nach Zugabe von 1 ml Szintillatorlösung bestimmt.

7.3 Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse

Folgende Berechnungen wurden mit den cpm-Werten der Radioaktivitätsmessungen durchgeführt:

1. Berechnung der eingesetzten Gesamtradioaktivität:

$$T = \text{cpm}_T \times 7$$

2. Berechnung der unspezifischen Bindung (%):

$$\text{UB}(\%) = \frac{\text{cpm}_{\text{UB}}}{T} \times 100$$

3. Berechnung der prozentualen Bindung bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität für Ansätze mit und ohne unmarkiertem Antigen:

$$\text{B}_0, \text{B}(\%) = \frac{(\text{cpm}_B - \text{cpm}_{\text{UB}})}{T} \times 100$$

4. Berechnung der relativen prozentualen Bindung bezogen auf die Bindung bei Abwesenheit von unmarkiertem Antigen:

$$\text{B/B}_0(\%) = \frac{(\text{cpm}_B - \text{cpm}_{\text{UB}})}{(\text{cpm}_{\text{B}_0} - \text{cpm}_{\text{UB}})} \times 100$$

Die Standardkurven wurden mit den B/B₀-Werten ermittelt.

5. Linearisierung der Standardkurven: Berechnung der logit-Transformation der B/B₀-Werte

$$\text{logit B/B}_0 = \ln \frac{\text{B/B}_0(\%)}{100 - \text{B/B}_0(\%)}$$

8. Applikationsexperimente

8.1 Applikation radioaktiv markierter Vorstufen an Pflanzen (A), Pflanzenteile (B) und Kalluskulturen (C)

A.

Pflanzen: 12 fünf-Tage-alte Keimlinge von Papaver somniferum versetzt in 6 Npfe einer Mikrotiterplatte

appliziert: 0,3 μCi markierte Vorstufe in 60 μl Wasser (0,025 μCi /Keimling); nach vollständiger Aufnahme (Dauer ca. 12 h) Nachfüllen von Wasser

uere Bedingungen: 20°C, 83% Luftfeuchtigkeit, 12-stndige künstliche Belichtung mit 2000 lux

Versuchsdauer: 2 d

B.

Pflanzenteile: Kapseln von Papaver somniferum nach Petalenfall

appliziert: 1 μCi markierte Vorstufe in 500 μl Wasser; mit Injektionsnadel Nr. 18 durch die Kapselwand gespritzt

Versuchsdauer: 2 d

C.

Kalluskulturen: von Tinospora cordifolia, 14 Tage alt

appliziert: 1 μCi markierte Vorstufe in 40 μl Wasser; unter sterilen Bedingungen aufgetropft

uere Bedingungen: Raumtemperatur, Dunkelheit

Versuchsdauer: 4 d

8.2 Applikation ^{13}C -markierter Vorstufen an Keimlinge (A) und ältere Pflanzen (B) von Papaver somniferum

A.

Keimlinge: 192 genau 5-Tage-alte Keimlinge von Papaver somniferum; versetzt in 96 Npfe einer Mikrotiterplatte

appliziert: 7,2 - 19,2 mg ^{13}C -markierte Vorstufe in 1920 μl

Wasser (d.h. 37 - 100 µg in 20 µl/Keimling); nach vollständiger Aufnahme Nachfüllen von Wasser

äußere Bedingungen: s. 8.1 A

Versuchsdauer: 2 d

B.

Pflanzen: 24 fünf-Wochen-alte Papaver somniferum-Pflanzen; Wurzeln in 12 Glasgefäße (Höhe 2 cm, Durchmesser 0,8 cm) gesteckt

appliziert: zweimal 3 mg (R,S)-1-¹³C-Coclaurin in 1,2 ml Wasser (250 µg/Pflanze) im Abstand von 10 h; danach Auffüllen mit Wasser

äußere Bedingungen: s. 8.1 A

Versuchsdauer: 2 d

8.3 Aufarbeitung der Gewebe

A. Aufarbeitung der Keimlinge

Zwei Tage nach erfolgter Applikation wurden die Keimlinge sorgfältig mit Wasser abgespült und zweimal in je 20 ml 80%igem Methanol für 10 min refluxiert. Handelte es sich um eine radioaktive Fütterung, so wurden das beim Spülen aufgefangene Wasser und die restliche Lösung aus den Näpfen der Mikrotiterplatte vereinigt und deren Radioaktivität bestimmt. Anhand dieser Größe kann man auf eventuelle Aufnahmeschwierigkeiten oder auf oxidative Vorgänge während der Fütterung schließen.

Die vereinigten methanolischen Extrakte wurden im Vakuum zur Trockne eingeengt (40°C) und in 10 ml Methanol wiederaufgenommen. Bei radioaktiven Versuchen wurde ein Aliquot zur Ermittlung der Gesamteinbaurate gezählt und 1/10 des methanolischen Extraktes zur Anfertigung von zweidimensionalen Chromatogrammen verwendet. Der Rest wurde in LM 8 (s. II.12) chromatographiert, die Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner ausgewertet und die Zone mit dem markiertem Thebain eluiert. Meist mußte Thebain danach noch in LM 9 (s.

II.12) gereinigt werden. Die Einbaurrate in Thebain wurde durch Auszählen eines Aliquots bestimmt.

Um möglichst alle radiomarkierten Metaboliten einer Fütterung qualitativ zu erfassen, wurden die methanolischen Extrakte in zweidimensionalen Chromatogrammen aufgetrennt (1.LM: Nr. 6; 2.LM: Nr.8) und Autoradiogramme (s. II.11) angefertigt. Zur Identifizierung konnte die Lage von Referenzalkaloiden mit der Lage der Schwärzungen verglichen werden.

Der methanolische Extrakt aus Fütterungen mit ^{13}C -markierten Vorstufen wurde zweimal chromatographiert (LM 8 und LM 4; s. II.12) wobei die Thebainzone bei 254 nm deutlich zu erkennen war. Die Konzentrationsbestimmung von gereinigtem Thebain erfolgte nach Aufnahme eines Spektrums photometrisch bei 285 nm ($\epsilon_{285}=7800$).

Anschließend wurden von Thebain aus den ^{13}C -Fütterungsexperimenten und von 4 mg nicht markiertem Thebain, das auch einen natürlichen ^{13}C -Gehalt von 1,1% pro C-Atom besitzt, ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen (Lösungsmittel CD_3OD ; s. II.13; Angaben zur Pulszahl s. III.1.2). Dabei ergab sich bei manchen Versuchen eine Verschiebung von bis zu 1,2 ppm zwischen dem ermittelten Peak aus markiertem Thebain und dem entsprechenden Peak der Vergleichssubstanz. Deswegen mußte für eine zweite Messung der ^{13}C -angereicherten Lösung 3,8 mg unmarkiertes Thebain zugesetzt werden. Nach gleicher Pulszahl wie bei der ersten Messung ließ sich nun eindeutig nachweisen, ob die Peaks von kaltem und markiertem Thebain identisch waren.

Da es nicht möglich war, aus der Peakhöhe auf den Markierungsgrad zu schließen, wurden von markiertem und unmarkiertem Thebain unter gleichen Aufnahmebedingungen nacheinander Massenspektren gemessen (s. II.13). In den Massenlisten wurden die Peakintensitäten auf den Molekülionenpeak bezogen. Aus diesen Peakintensitäten kann man nach Korrektur um den natürlichen ^{13}C -Gehalt den Markierungsgrad ermitteln (HESSE et al., 1984).

Diese Berechnung soll im folgenden am Beispiel von unmarkiertem Thebain und ^{13}C -markiertem Thebain, welches aus einem (R,S)-1- ^{13}C -Cocclaurin-Applikationsexperiment isoliert und gereinigt worden war (s. III.1.2), genauer erläutert werden:

a.) Meßresultate aus einem EI-Massenspektrum:

m/z	Peakintensitäten von	
	unmarkiertem Thebain	^{13}C -markiertem Thebain
312 (M+1) ⁺	22%	43%
311 (M) ⁺	100%	100%

b.) Korrektur auf den natürlichen ^{13}C -Gehalt (1,1% x 19 C-Atome = 20,9%)

m/z	Peakintensitäten von	
	unmarkiertem Thebain	^{13}C -markiertem Thebain
312 (M+1) ⁺	1,3%	22%
311 (M) ⁺	100 %	100%

c.) Korrektur um weitere Isotopenanteile:

$$^2\text{H}: 0,015\% \times 21 \text{ H-Atome} = 0,32\%$$

$$^{15}\text{N}: 0,37\% \times 1 \text{ N-Atom} = 0,37\%$$

$$^{17}\text{O}: 0,04\% \times 3 \text{ O-Atome} = 0,12\%$$

$$\text{Summe: } 0,81\%$$

m/z	Peakintensitäten von	
	unmarkiertem Thebain	^{13}C -markiertem Thebain
312 (M+1) ⁺	0,5%	21,2%
311 (M) ⁺	100 %	100 %

Bei den restlichen 0,5% von m/z = 312 des unmarkierten Thebains handelt es sich hauptsächlich um ein (M+H⁺)-Ion.

d.) Korrektur um $(M+H^+)$ -Ion (0,5%):

m/z	Peakintensitäten von	
	unmarkiertem Thebain	^{13}C -markiertem Thebain
312 $(M+1)^+$	0%	20,7%
311 $(M)^+$	100%	100 %

Der Markierungsgrad des ^{13}C -markierten Thebains beträgt demzufolge 20,7%.

B. Aufarbeitung von Kalluskulturen

Die Kalli wurden vor der Extraktion gewogen, 10 ml Methanol pro g Frischgewicht zugegeben und anschließend mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Dieser Vorgang wurde nach Abfiltrieren mit dem Rückstand wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer (40°C) eingengt. Nach Bestimmung der Gesamteinbaurrate wurde der Extrakt in LM 1 (s. II.12) chromatographiert, die radioaktive Bande auf Höhe von Stepharin mit Methanol eluiert und ein zweites Mal in LM 5 (s. II.12) gereinigt. Durch Ermittlung der Radioaktivität im zweiten Eluat konnte die Einbaurrate in Stepharin berechnet werden.

C. Aufarbeitung von älteren Pflanzen von Papaver somniferum

Die 5-Wochen-alten Pflanzen mußten vor der Extraktion, die wie unter 8.3 A ablief, gut zerkleinert werden. Zur Reinigung wurde viermal chromatographiert, wobei jedesmal die bei 254 nm deutlich erkennbare Morphinzone eluiert wurde (1. LM: Nr.8 auf zwei Kieselgeldickschichtplatten; 2. LM: Nr.9, 3. LM: Nr.4, 4. LM: Nr.9; für 2.-4. LM Kieselgeldünnschichtplatten). Die weitere Identifizierung und Quantifizierung erfolgte wie unter 8.3 A, indem von isoliertem Morphin ein UV-, ein ^{13}C -NMR- und ein Massenspektrum aufgenommen wurde.

D. Aufarbeitung von Pflanzenteilen

Die Kapseln von Papaver somniferum wurden wie größere Pflanzen (s. 8.3 C) aufgearbeitet und ein Aliquot des Methanolextraktes gezählt. Der Extrakt wurde auf zwei Kieselgeldickschichtplatten in LM 8 (s. II.12) aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung am Scanner bestimmt. Banden auf Höhe von Thebain, Codein und Morphin wurden eluiert und die spezifische Aktivität bestimmt. Um dabei eine Konstanz zu erreichen, mußte jede der drei Substanzen noch zweimal chromatographiert werden (2. LM: Nr. 9, 3. LM: Nr. 10; s. II.12).

8.4 Derivatisierung von radioaktiv markiertem Thebain

A.

Aufgrund seiner Struktur kann Thebain mit ungesättigten Verbindungen wie 1,4-Naphthochinon oder Maleinsäureanhydrid Diels-Alder-Addukte bilden. Diese Reaktion eignet sich gut für Halbmikropräparationen, wie Sandermann mit Thebain und Maleinsäureanhydrid nachwies (SANDERMANN, 1938). Im folgenden wurde die von ihm beschriebene Synthese modifiziert, um radioaktiv markiertes Thebain zu derivatisieren.

Aus einem Fütterungsversuch mit (S)-6- $O^{14}CH_3$ -Cocclaurin isoliertes und gereinigtes radiomarkiertes Thebain (10000 cpm) wurde mit 5,25 mg Thebain (17 μ mol) und 6,05 mg Maleinimid (62 μ mol) in 600 μ l Benzol 90 min lang bei 80°C im Bombenrohr erhitzt. Dabei bildete sich ein starker Niederschlag, welcher nach beendigter Reaktion in Chloroform aufgenommen und in LM 1 und in LM 11 (s. II.12) zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt wurde (563 cpm/ μ mol; 0,3 μ Ci/mmol).

Das Addukt von Thebain mit Maleinimid war zuvor unmarkiert synthetisiert worden. Bei einer Wellenlänge von 284 nm beträgt sein Extinktionskoeffizient 1470. Massen- und NMR-Spektren bewiesen die Identität und Reinheit der Additionsverbindung.

MS (EI): M^+ =408 (47%), m/z =393 (13%), 310 (24%), 255 (37%), 233 (100%), 190 (93%), 162 (50%)

$^1\text{H-NMR}$ (CHCl_3): 6,64 ppm (1H, d, J8Hz, ArH), 6,57 ppm (1H, d, J8Hz, ArH), 5,84 ppm (1H, d, J9Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5,44 ppm (1H, d, J9Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 4,64 ppm (1H, s, OCH)

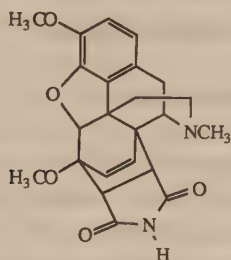


Abb. 8 Struktur des Cycloadduktes von Thebain mit Maleinimid

B.

Radiomarkiertes Thebain konnte nach der Vorschrift von Krausz an der C-6-Position selektiv zu Codeinon demethyliert werden (KRAUSZ, 1963). Dieses ließ sich weiter zu Codein reduzieren; von allen Substanzen wurde nach jedem Reinigungsschritt die spezifische Aktivität bestimmt.

Eine Mischung von radiomarkiertem Thebain (26256 cpm) und 1,6 mg Thebain (5 μmol) in 600 μl getrocknetem Dichlormethan wurde unter Rühren auf -5°C gekühlt. Bei Zugabe von 0,2 g HBr in 1 ml trockenem Diisopropylether stieg die Temperatur auf 10°C an, auf der sie 5 min lang gehalten wurde. Anschließend wurde der pH-Wert des Ansatzes mit 1 molarer Natriumcarbonatlösung auf 8 eingestellt, die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte in vacuo eingeeengt (30°C). Dabei bildete sich ein fester Rückstand, der in LM 1 (s. II.12) chromatographisch

aufgetrennt wurde. So erhaltenes Codeinon ließ sich in Methanol mit Natriumborhydrid zu Codein reduzieren. Dieses wurde in LM 6 und LM 9 (s. II.12) weiter gereinigt.

MS (CI) Codeinon: $M+H^+=298$ (100%), $m/z=282$ (64%)

MS (CI) Codein: $M+H^+=300$ (20%), $m/z=282$ (100%)

9. Elektrophoretische Trennverfahren

9.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung ist eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten, die eine Trennung aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte bewirkt. Für präparative Zwecke kann sie u.a. in einem granulierten Flachgel durchgeführt werden. Dazu wurde nach der Vorschrift von FREY und RADOLA (1982) das Volumen für ein 1mm-dickes Gelbett (6,2 cm x 25,9 cm) berechnet, die entsprechende Menge (16 ml) an gequollenem und gewaschenem Sephadex G-200 Superfine-Material mit 0,8 ml Trägerampholyten (Endkonzentration 2%) gemischt und entgast und das Gel auf eine entfettete Glasplatte gegossen. Der Trocknungsvorgang konnte durch vorsichtiges Föhnen beschleunigt werden und war beendet, wenn sich am Gelrand feine 1-3 mm lange Risse bildeten. Danach wurde die Glasplatte auf die mit nichtleitendem n-Decan angefeuchtete Kühlplatte des Fokussiergerätes gelegt. Die Probe, die mindestens 1 mg Protein enthalten und entsalzt sein sollte, wurde in einem Rechteck von 5,5 cm x 2 cm in Nähe der Kathode aufgetragen. Die Vorfokussierung erfolgte in 12 h bei 400 V, anschließend wurden für drei Stunden 2000 V angelegt. Die Kühltemperatur durfte dabei nicht mehr als 2°C betragen.

Zum Färben wurden 2 cm breite Streifen einer Celluloseacetatmembran auf das Gel gerollt, nach 1 min wieder abgehoben und in 10%iger Trichloressigsäure fixiert. Die Färbung erfolgte in 1% Ponceau S in 10%iger Trichloressigsäure, ent-

färbt wurde für einige Sekunden in 5%iger Essigsäure. Diese Färbemethode bietet mit ihrer hohen Empfindlichkeit und extrem kurzen Dauer von 2 min wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Techniken.

Entsprechend den gefärbten Proteinbanden konnte das Gel mit einem Spatel abgehoben und in Wasser extrahiert werden. Nach wenigen Minuten war es möglich, den pH-Wert dieser Gel-Wasser-Mischungen und damit den isoelektrischen Punkt der eluierten Enzyme zu bestimmen.

Zur Entfernung der Trägerampholyte wurde das abgehobene Gel in einer Biotrap-Apparatur mit Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris, 160 mM Glycin) überschichtet und während drei Stunden einer Elektrodialyse bei 200 V unterworfen. Dabei konnte die Probe auf ein Volumen von 200 µl konzentriert werden.

An dieser Stelle möchte ich Herrn W. Fahn herzlich danken, der mit Rat und Tat die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung ermöglichte.

9.2 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Native Diskelektrophorese wurde für präparative Proteinreinigungen eingesetzt. Dabei erwies sich das Gelsystem Nr.1 nach MAURER (1968) mit einer Polyacrylamidkonzentration von 7,5% bei pH 6,9-8,9 als geeignet. Auf vertikale Flachgele (Länge 15 cm, Dicke 2 mm, Breite 15 cm, Sammelgelhöhe 2 cm) konnten bis zu 10 ml vorgereinigter Enzymlösung aufgetragen werden; dabei war meist ein Zusatz von Saccharose zur Dichteerhöhung notwendig. Zur Markierung der Front diente Bromphenolblau. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über Nacht bei 20 mA.

Bis auf einen Randstreifen wurde das Gel in 0,5 cm breite Banden segmentiert, welche einige Stunden in jeweils 5 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 bei 4°C extrahiert wurden. Der Randstreifen wurde mit Coomassie-Blau gefärbt (6 h; 0,25% w/v Coomassie Blue G-250 in Methanol-Eisessig-Wasser 5 - 1 - 5); als Entfärbelösung diente die Mischung aus Metha-

nol-Eisessig-Wasser 5 - 7,5 - 87,5.

Denaturierende SDS-Gelelektrophorese, die vor allem zur Bestimmung des Molekulargewichtes und zur Prüfung auf Homogenität dient, wurde nach einer modifizierten Laemmli-Vorschrift durchgeführt (BLACKSHEAR, 1984). Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels betrug 12,5%, die Dicke 1 mm. Als Standard wurden Proteine mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen (MW-SDS-Blue Kit, Sigma). Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 4°C in 7 h bei 20 mA.

Zur Färbung von SDS-Gelen wurde die Vorschrift von Neuhoff angewandt (NEUHOFF et al., 1985). Dazu mußte das Gel mindestens 1 h in 12%iger Trichloressigsäure fixiert werden. Gefärbt wurde mit 0,1% Coomassie Blue G-250 in 2%iger Trichloressigsäure. Diese Lösung war für jeden Färbevorgang frisch herzustellen und mußte alle 10-15 h erneuert werden. Zum Neutralisieren wurde das Gel 1-3 min in 0,1 M Puffer pH 6,5 gelegt, anschließend mit 25%igem Methanol abgespült und in 20%iger Ammoniumsulfatlösung bei 4°C aufbewahrt. Sollte das Gel getrocknet werden (Geltrockner, LKB), so wurde es nach dem Abspülen mit Methanol 30 min lang in 3% Glycerin gelegt.

10. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von BENSADOUN und WEINSTEIN (1976). Sollten relative Proteinkonzentrationen wie z. B. die eines Säuleneluates gemessen werden, so wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) verfahren: 10 µl einer proteinhaltigen Lösung wurden in den Näpfen einer Mikrotiterplatte mit 140 µl Bradfordreagens versetzt und nach 5 min die Extinktion bei 570 nm bestimmt (Microplate Reader MR 600, Dynatech). Zum Abgleich diente ein Ansatz mit 10 µl Wasser.

11. Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivität von Lösungen wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillator (Rotiszint, Roth) in einem Szintillationszähler (Betaszint BF 5004, Berthold) gemessen. Die Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit dem Dünnschichtscanner LB 2722-2 oder mit dem TLC Linear Analyzer (beide Berthold) qualitativ und quantitativ bestimmt. Zweidimensionale Chromatogramme wurden zur Ermittlung der qualitativen Radioaktivitätsverteilung auf Röntgenfilme (Industrex AX 18 x 24, Kodak) bei Raumtemperatur exponiert. Bei Benutzung eines Verstärkersprays (En³hance THSpray, DuPont) erfolgte die Exposition bei -70°C. Nach 3 - 4 Wochen wurden die Filme entwickelt und fixiert (Entwickler und Fixierer von Adefo Chemie).

12. Chromatographische Methoden

Die chromatographische Trennung von Alkaloiden erfolgte bis zu 1 mg auf 0,25 mm Kieselgel-DC-Folien (Polygram Sil G/-UV₂₅₄), auf 0,1 mm Celluloseplatten (MN 300 UV₂₅₄, beide von Macherey und Nagel) oder auf Whatmann Papier Nr. 1 (Schleicher & Schuell). Größere präparative Auftrennungen wurden auf selbstgestrichenen 1,5 mm Kieselgeldickschichtplatten (Kieselgel GF₂₅₄ Typ 60, Merck) durchgeführt.

Folgende Laufmittel (LM) wurden verwendet:

- | | |
|---|-----------|
| 1. Ethylacetat-Methylethylketon-Ameisensäure-Wasser | 5-3-1-1 |
| 2. Chloroform-Ethylacetat | 7-3 |
| 3. Benzol-Ethanol | 95-5 |
| 4. Dichlormethan-Methanol-Ammoniak (25%) | 90-9-1 |
| 5. Chloroform-Methanol-Ammoniak (25%) | 68-18-0,6 |
| 6. Aceton- Chloroform-Diethylamin | 5-4-1 |
| 7. n-Butanol-Eisessig-Wasser
(obere Phase) | 4-1-5 |
| 8. Toluol-Ethylacetat-Diethylamin | 7-2-1 |

9. Chloroform-Ethanol-Ethylacetat-Aceton	6-2-1-1
10. Toluol-Aceton-Ethanol-Ammoniak (25%)	40-40-6-2
11. Chloroform-Ethylacetat-Ethanol	5-4-1
12. Chloroform-Methanol-Ammoniak (25%)	90-9-1
13. Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser	48-18-3-0,3

Zur Auftrennung von Alkaloidrohextrakten für die anschließende Untersuchung im Radioimmunttest wurde die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie eingesetzt:

Vorsäule: Vydac SC-201 RP, 4 mm x 5 cm (Macherey und Nagel)

Säule: Nucleosil C-18 10 µm, 4 mm x 25 cm (Macherey und Nagel)

Fließmittel: - Komponente A: 95% Wasser-5% Acetonitril-0,01% Phosphorsäure

- Komponente B: 10% Wasser-90% Acetonitril-0,01% Phosphorsäure

Gradient:	Zeit (min)	Komp. A (%)	Komp. B (%)
	0	90	10
	5	90	10
	25	81	19
	35	0	100
	40	90	10

Flußrate: 1,5 ml/min

Detektion: Extinktion bei 285 nm

Mittels eines automatischen Probenaufgebers wurden jeweils 20 µl der zu untersuchenden Lösung aufgegeben, wobei nach jedem Lauf die Trennsäule mit 90% der Komponente A äquili-briert wurde. Dadurch dauerte eine Analyse 45 min.

13. Spektroskopische Methoden

Massenspektren wurden an einem Finnegan MAT 44S Massenspektrometer mit Elektronenstoßionisation (70 eV) oder chemischer Ionisation (180 eV) oder an einem Kratos MS 80 mit Elektronenstoßionisation (70 eV) aufgenommen. Für die Mes-

sungen danke ich Herrn Dr. O. Seligmann, Herrn Dr. M. Schumacher, Herrn Dr. T. Frenzel und Herrn R. Stadler.

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 360 bzw. 90 MHz mit einem Bruker AM 360 registriert, wofür ich Herrn R. Stadler herzlich danke.

Für UV-Spektren und Extinktionsmessungen wurden die Spektralphotometer DMR 11 (Zeiss) und Uvikon 810 (Kontron) eingesetzt.

III. ERGEBNISSE

1. Applikationsexperimente an Papaver somniferum

1.1 Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Thebain

Mit der Absicht zur Klärung der frühen Schritte der Morphinbiosynthese beizutragen, wurden Applikationsexperimente an Keimlingen von Papaver somniferum durchgeführt. Zu diesem Zweck kamen radioaktiv markierte potentielle Vorstufen zum Einsatz, die entweder wie Norlaudanolin und Retikulin als Vorläufer der Morphinanalkaloide bereits bekannt waren (BATTERSBY et al., 1964) oder die wie Norcoclaurin und dessen Derivate bisher noch nicht an Papaver somniferum appliziert worden waren.

Die Versuche erfolgten an Keimlingen von Papaver somniferum (Anzucht s. II.1), die für Fütterungsexperimente große Vorteile boten: Sie waren jeden Tag in jeder Altersstufe in großen Mengen verfügbar und nahmen durch das Wurzelsystem innerhalb von 12 h Lösungen mit einem Volumen zwischen 10 und 25 μ l vollständig auf. Darüberhinaus erforderte die kleine Menge an Pflanzenmaterial einen wesentlich geringeren Einsatz an markierten Vorstufen, als dies z.B. bei 4-6 Wochen alten Pflanzen der Fall gewesen wäre.

Wie Untersuchungen im Radioimmuntest ergaben, ist in fünf-Tage-alten Papaver somniferum-Keimlingen kein Morphin und nur sehr wenig Codein (<50 ng/Pflanze) nachzuweisen, wogegen der Gehalt an Thebain zu diesem Zeitpunkt bereits 600 ng/Keimling beträgt (WIECZOREK, 1985). Daher ist anzunehmen, daß die Enzymsysteme, die die Biosynthese zum Thebain katalysieren, in fünf-Tage-alten Keimlingen in hohem Maße ausgebildet sein müssen, was Applikationsexperimente zu diesem Zeitpunkt begünstigen würde. Erst ab dem 7. Tag der Keimung treten die Enzyme auf, die Thebain über Codein zu Morphin metabolisieren, so daß bei einer Applikationszeit zwischen dem 5. und dem 7. Tag der Keimung nur Inkorporation in

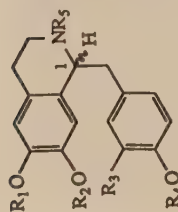
Thebain erfolgen dürfte.

Die Fütterungsversuche verliefen wie unter II.8.1 A beschrieben, wobei zwischen 5,3 und 6,8 nmol ^{14}C -markierte Vorstufe an jeweils 12 Keimlinge appliziert wurden, was einer Radioaktivitätsmenge von 0,3 μCi entsprach. 7- ^3H -Salutaridinol I und II bildeten dabei mit 0,75 μCi eine Ausnahme, da aufgrund der Markierung mit Tritium mehr an Radioaktivität eingesetzt werden mußte.

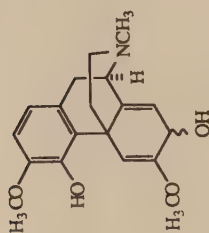
Nach 48 h Versuchsdauer wurden die Keimlinge aufgearbeitet und das isolierte markierte Thebain gereinigt (s. II.8.3 A). Nach zwei chromatographischen Auftrennungen war eine konstante spezifische Aktivität von durchschnittlich $5,8 \times 10^5$ dpm/ μmol erreicht. Für einen zusätzlichen Identitätsnachweis wurde markiertes Thebain - wie unter II.8.4 A beschrieben - nach Zusatz von unmarkierter Substanz mit Maleinimid zu einem Diels-Alder-Addukt umgesetzt, welches sich ebenfalls bis zur konstanten spezifischen Aktivität von 665 dpm/ μmol reinigen ließ.

Die Einbauraten der verschiedenen potentiellen Vorstufen in Thebain sind in Tabelle 2 aufgelistet. Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß durchschnittlich nur 20 - 30% der applizierten Radioaktivität im methanolischen Extrakt wiedergefunden werden konnte. Möglicherweise war ein großer Teil der markierten Alkaloide an Bestandteile der Zellwände gebunden worden (vgl. PETIARD et al., 1985).

(R,S)-3- ^{14}C -Norcocclaurin und (R,S)-3- ^{14}C -Norlaudanolin wurden beide mit nur 0,2% zu einem relativ kleinen Ausmaß in Thebain eingebaut, was wohl aber von Strukturen mit drei oder vier freien Hydroxylgruppen nicht anders zu erwarten war. Die starke Oxidationsempfindlichkeit zeigte sich bereits während der Fütterungsversuche, als sich die Wurzeln der Keimlinge innerhalb weniger Stunden dunkelbraun färbten; Turgor und Blattfarbe änderten sich jedoch nicht. Im übrigen entspricht die gefundene Einbaurate von (R,S)-3- ^{14}C -Norlaudanolin in Thebain mit 0,2% genau derjenigen, die bei Fütterungsversuchen an Kapseln von Papaver somniferum er-



Norcoclaurin: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$
 Norlaudanolin: $R_1=R_2=R_4=R_5=H$; $R_3=OH$
 Coclaurin: $R_1=CH_3$; $R_2=R_3=R_4=R_5=H$
 N-Methylcoclaurin: $R_1=R_5=CH_3$; $R_2=R_3=R_4=H$
 Norretikulil: $R_1=R_4=CH_3$; $R_2=R_5=H$; $R_3=OH$
 Retikulil: $R_1=R_4=R_5=CH_3$; $R_2=H$; $R_3=OH$
 $1H=\alpha$ (S); $1H=\beta$ (R)



-OH= β -Salutaridinol I
 -OH= α -Salutaridinol II

applizierte Vorstufe	spez. Aktivität (mCi/mmol)	appl. Menge (nmol)	abs. Einbau (%)
(R,S)-3- ¹⁴ C-Norcoclaurin	50	6,0	0,2
(R,S)-3- ¹⁴ C-Norlaudanolin	50	6,0	0,2
(S)-6-0 ¹⁴ CH ₃ -Coclaurin	59	5,4	5,7
(R)-6-0 ¹⁴ CH ₃ -Coclaurin	59	5,4	0
(S)-N- ¹⁴ CH ₃ -Coclaurin	59	5,4	0,5
(R)-N- ¹⁴ CH ₃ -Coclaurin	59	5,4	0
(S)-6-0 ¹⁴ CH ₃ -Norretikulil	44	6,8	3,7
(R)-6-0 ¹⁴ CH ₃ -Norretikulil	44	6,8	5,8
(S)-N- ¹⁴ CH ₃ -Retikulil	44	6,8	1,7
(R)-N- ¹⁴ CH ₃ -Retikulil	44	6,8	7,0
7- ³ H-Salutaridinol I	102	7,3	13,4
7- ³ H-Salutaridinol II	102	7,3	0

Tab. 2 Einbau radioaktiv markierter potentieller Vorstufen in Thebain.

zielt wurde (BATTERSBY et al., 1964).

(S)-6- 0^{14}CH_3 -Cocclaurin wurde mit 5,7% sehr gut in Thebain eingebaut. Dies läßt sich recht beeindruckend darstellen, wenn nach der chromatographischen Auftrennung des methanolischen Extraktes die Radioaktivitätsverteilung mittels Dünnschichtscanner aufgezeichnet wird:

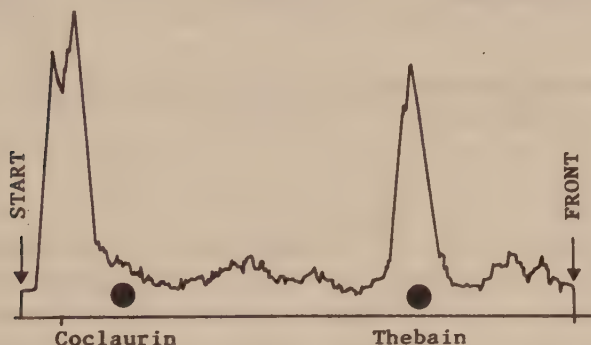


Abb. 9 Metabolisierung von (S)-6- 0^{14}CH_3 -Cocclaurin in Keimlingen von Papaver somniferum; Laufmittel 8 (vgl. II.12).

Um nachzuweisen, daß sich die Markierung wirklich an der erwarteten 6- OCH_3 -Position in Thebain befand, wurde das isolierte Thebain nach Verdünnung mit unmarkierter Substanz (spez. Aktivität 6180 dpm/ μmol) zu Codeinon demethyliert und anschließend zu Codein reduziert (s. II.8.4 B). Die spezifische Aktivität des Codeinons betrug aufgrund kleiner Verunreinigungen noch 370 dpm/ μmol , während in dem gereinigten Codein keine Markierung mehr festzustellen war. Folglich hatte sich die ^{14}C -Markierung tatsächlich an der 6- OCH_3 -Position in Thebain befunden.

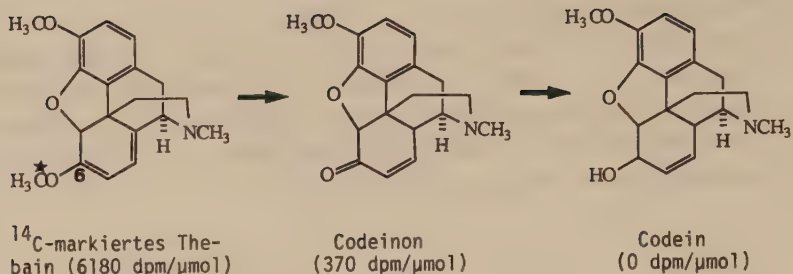


Abb. 10 Umsetzung von radioaktiv markiertem Thebain zu Codein (s. II.8.4 B).

Im Gegensatz zu (S)-6- O^{14}CH_3 -Cocclaurin zeigte (R)-6- O^{14}CH_3 -Cocclaurin keinen Umsatz zu Thebain. Auch (R)- N^{14}CH_3 -Cocclaurin wurde nicht zu Thebain metabolisiert, während (S)- N^{14}CH_3 -Cocclaurin zu 0,5 % eingebaut wurde. Das weist darauf hin, daß nur die (S)-Enantiomere von Cocclaurin und Cocclaurinderivaten mögliche Vorstufen der Opiumalkaloide sind. Dagegen wurden von markiertem Norretikulin und Retikulin sowohl die (R)- als auch die (S)-Enantiomere in Thebain inkorporiert, was schon bei früheren Fütterungsversuchen mit (R)- und (S)-Retikulin gefunden worden war (BATTERSBY et al., 1965a). (R)- N^{14}CH_3 -Retikulin zeigte mit 7,0% die höchste Einbaurrate. Die Ergebnisse der Applikationsexperimente mit 7- ^3H -Salutaridinol I und II, nämlich daß nur Salutaridinol I die richtige Stereochemie für eine Metabolisierung zu Thebain aufweist, stimmten mit denjenigen von BARTON et al. (1965b) an Kapseln von Papaver somniferum überein. Das läßt den Schluß zu, daß das Keimlingssystem mit dem Kapselsystem durchaus vergleichbar ist.

Um einen visuellen Eindruck von der in vivo - Umsetzung der einzelnen markierten Vorstufen zu Thebain zu erhalten und um möglichst alle radioaktiv markierten Metaboliten qualitativ

zu erfassen, wurden - wie unter II.8.3 A beschrieben - nach jedem Fütterungsversuch 0,01 μCi des methanolischen Extraktes in zweidimensionalen Chromatogrammen aufgetrennt und damit Autoradiogramme angefertigt. Auf die Chromatogramme der 7- ^3H -Salutaridinol I und II - Applikationsexperimente wurden 0,08 μCi aufgetragen; außerdem mußte hier ein Verstärkerspray benutzt werden, um die Tritiumaktivität autoradiographisch sichtbar machen zu können (s. II.12).

Die Auswertung der Autoradiogramme ergab, daß alle Ergebnisse den Einbau in Thebain betreffend bestätigt werden konnten. Beim Vergleich der Autoradiogramme der (R)- und (S)-6- $^{14}\text{CH}_3$ -Cocclaurin-Fütterungsversuche wurde wiederum die so unterschiedliche Metabolisierung der beiden Enantiomere deutlich, während auf den Autoradiogrammen der in vivo Umsetzung von (R)- und (S)-N $^{14}\text{CH}_3$ -Retikulin erkennbar war, daß beide Vorstufen in Thebain inkorporiert wurden (vgl. Abb. 11). Außerdem war es möglich, auf den Autoradiogrammen der (S)-6- $^{14}\text{CH}_3$ -Cocclaurin-, der (R)- und (S)-N $^{14}\text{CH}_3$ -Norretikulin- und der (S)-N $^{14}\text{CH}_3$ -Retikulinfütterungsversuche weitere Metabolisierungsprodukte anhand von Schwärzungen zu erkennen. Ob es sich dabei um Zwischenprodukte der Morphinbiosynthese oder einfach um methylierte Derivate der applizierten Benzylisochinoline handelte, wurde nicht weiter untersucht.

Um den Einbau von (S)-6- $^{14}\text{CH}_3$ -Cocclaurin in Thebain auch im Kapselsystem zu bestätigen, wurde - wie unter II.8.1 B beschrieben - 1 μCi dieser markierten Vorstufe durch die Wand einer Papaver somniferum-Kapsel gespritzt, die einen Tag zuvor die Blütenblätter verloren hatte. Nach zwei Tagen wurde die Kapsel aufgearbeitet und die Opiumalkaloide Morphin, Codein und Thebain chromatographisch gereinigt (Aufarbeitung und Reinigung s. II.8.3 D). Die Einbaurate in Thebain betrug unter diesen Bedingungen 1,9%, die spezifische Aktivität des gereinigten Thebains 26400 dpm/ μmol . In Morphin und Codein konnte keine Markierung festgestellt werden, was damit übereinstimmt, daß die markierte Methylgruppe beim

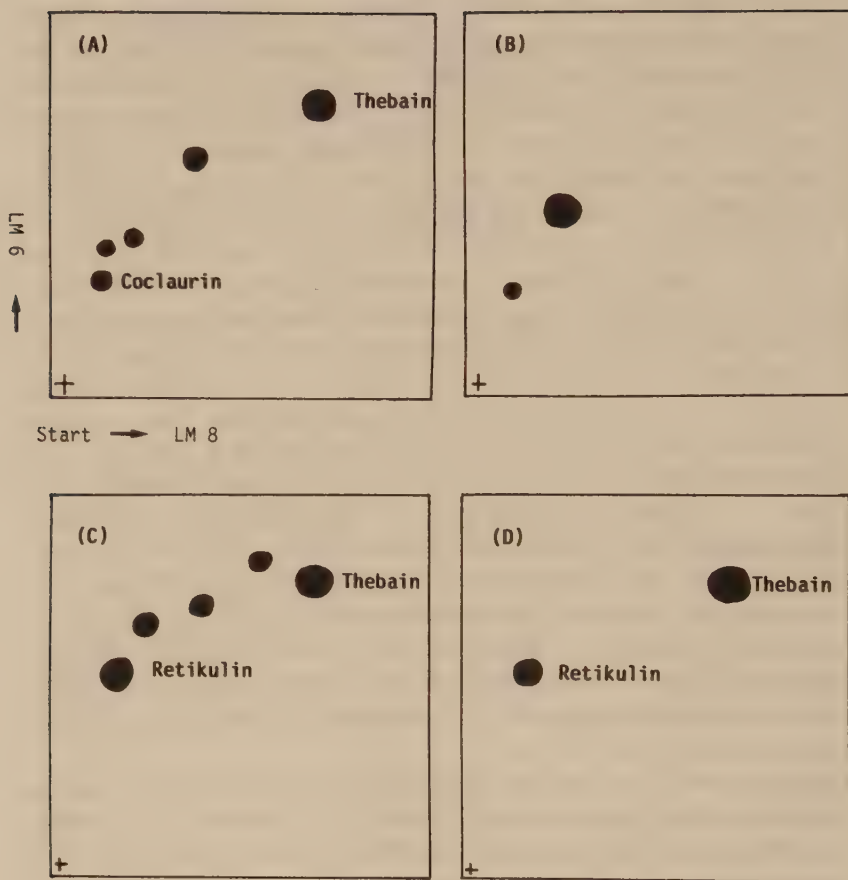


Abb. 11 In vivo - Umsetzung von (S)-6- $O^{14}CH_3$ -Coclaurin (A), (R)-6- $O^{14}CH_3$ -Coclaurin (B), (S)-N- $^{14}CH_3$ -Retikulin (C), (R)-N- $^{14}CH_3$ -Retikulin (D) in Keimlingen von Papaver somniferum; Autoradiogramme nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie des methanolischen Extraktes (vgl. II.8.3).

Übergang von Thebain in Codein und Morphin verloren geht. Diese Feststellung mußte auch bei der Verlängerung der Versuchsdauer um weitere 5 Tage getroffen werden: in Thebain war keine Markierung mehr nachzuweisen, da es höchstwahrscheinlich vollständig zu Codein und Morphin metabolisiert worden war.

Ein Applikationsexperiment mit doppelt markiertem Cocclaurin sollte den Beweis erbringen, daß die radioaktiv markierte Methylgruppe während der Metabolisierung an der 6-O-Position erhalten bleibt. Zu diesem Zweck wurde (R,S)-6-OC³H₃,9-¹⁴C-Cocclaurin mit einem ³H:¹⁴C-Verhältnis von 1:32 unter den üblichen Bedingungen an Papaver somniferum-Keimlinge appliziert (0,12 µCi ¹⁴C, 4,12 µCi ³H; s. II.8.1 A). Nach zwei Tagen erfolgte die Aufarbeitung und chromatographische Reinigung von markiertem Thebain (vgl. II.8.3 A). Die Einbaurrate wurde mit 0,5% bestimmt. Das ³H:¹⁴C-Verhältnis betrug 1:33,7, war also im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant geblieben. Damit war anzunehmen, daß markiertes Cocclaurin unverändert in Thebain inkorporiert wurde und daß keine O-De- und/oder Remethylierung stattgefunden hatte.

1.2 Einbau ¹³C-markierter Vorstufen in Opiumalkaloide

Zur Bestätigung und zur Erweiterung der Applikationsexperimente mit radioaktiv markierten Vorstufen wurden Fütterungsversuche mit ¹³C-markierten potentiellen Vorstufen durchgeführt. Vor allem sollte dabei noch einmal der Nachweis geführt werden, daß der Einbau von markiertem Cocclaurin in Thebain ohne Veränderung des Moleküls stattfindet. Dabei bot das Arbeiten mit ¹³C-markierten Substanzen wesentliche Vorteile: Durch Vergleich mit dem vollständig zugeordneten ¹³C-NMR-Spektrum der unmarkierten Substanz konnte bei der ¹³C-angereicherten Verbindung eindeutig festgestellt werden, an welchem C-Atom des Moleküls sich die Markierung befand. Dadurch entfielen arbeitsaufwendige Abbaumethoden und Deri-

vatisierungen des markierten Produktes.

Die Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen verliefen ähnlich wie diejenigen mit radioaktiv markierten Vorläufern, nur daß nun wesentlich größere Substanzmengen an die Keimlinge appliziert wurden. Dazu mußten - wie unter II.8.2 A beschrieben - 192 fünf-Tage-alte Keimlinge von Papaver somniferum in 96 Näpfe einer Mikrotiterplatte gesetzt werden, in die zwischen 75 und 200 μg an gelöster ^{13}C -markierter Verbindung pro Napf gefüllt wurde.



Abb. 12 7-Tage-alte Keimlinge von Papaver somniferum am Ende eines Fütterungsexperimentes mit (R,S)-1- ^{13}C -Cocclaurin.

Nach zweitägiger Applikationszeit erfolgte die Aufarbeitung der Keimlinge und die Reinigung und Charakterisierung des markierten Thebains analog II.8.3 A: Für jeden Fütterungsversuch wurde isoliertes Thebain über seinen Extinktionskoeffizienten photometrisch quantifiziert, ein ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum (Lösungsmittel CD_3OD , 90 MHz, 297 K) registriert und ein EI-Massenspektrum zur Berechnung des Markie-

rungsgrades aufgenommen. Der Zusatz von unmarkiertem Thebain zur ^{13}C -angereicherten Lösung und nochmalige Messung eines ^{13}C -NMR-Spektrums war in einigen Fällen nötig, um den nach einem Fütterungsversuch ermittelten ^{13}C -Peak eindeutig zuzuordnen zu können (vgl. II.8.3 A).

In Tabelle 3 werden die Daten aller Fütterungsversuche einschließlich des berechneten ^{13}C -Markierungsgrades aufgeführt. Dazu sind in Abb. 13 a und b die ^{13}C -NMR-Partialspektren dargestellt, zum Vergleich dient ein ^{13}C -NMR-Spektrum von 5 mg unmarkiertem Thebain (Pulszahl 1566). Die Zuordnung der Signale erfolgte nach CARROLL et al. (1976), wobei die chemische Verschiebung auf das Lösungsmittel CD_3OD bezogen und in ppm angegeben wurde. Die Auswertung der ^{13}C -NMR-Spektren der Fütterungsversuche wurde analog durchgeführt. L-2- ^{13}C -Tyrosin wurde sowohl in die Isochinolin- (C-16) als auch in die Benzylhälfte (C-9) von Thebain eingebaut, was Ergebnissen früherer Applikationsexperimente mit radioaktiv markiertem Tyrosin entsprach (NEUBAUER, 1965). Ob der Einbau in die beiden Hälften genau im Verhältnis 1:1 erfolgt war, ließ sich anhand der Peakhöhen nicht feststellen.

Im Gegensatz zu Tyrosin markierte 8- ^{13}C -Tyramin nur die C-16-Position, wurde also nur in die Isochinolinhälfte des Thebains inkorporiert. Möglicherweise ist dieser Tatbestand einer zu schwachen Aminoxidaseaktivität in den Keimlingen zuzuschreiben. Die ^{13}C -Anreicherung in Thebain lag für 8- ^{13}C -Tyramin und L-2- ^{13}C -Tyrosin mit 42 bzw. 41% in der gleichen Größenordnung.

Nach Fütterungen mit (R,S)-1- ^{13}C -Norcoclaurin und (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin fand sich die Markierung in der C-9-Position von Thebain wieder. Um nun eindeutig zu zeigen, daß es sich bei dem gefundenen Signal tatsächlich um das C-9-Atom von Thebain handelte, wurde die Messung des ^{13}C -markierten Thebains, das aus der (R,S)- ^{13}C -Coclaurin-Fütterung stammte, unter Zusatz von 3,8 mg unmarkiertem Thebain wiederholt. Nach einer Pulszahl von 13991 ließ sich beeindruckend demonstrieren, daß sich nur das C-9-Signal stark vergrößert hat-

applizierte Vorstufe	appl. Menge (μmol)	Menge an isoliertem Thebain (μg)	Pulszahl	ermitteltes ^{13}C -Signal (ppm)	^{13}C -Markierungs- grad (%)
L-2- ^{13}C -Tyrosin	79,6	130	10 277	47,020 (C-16) 62,939 (C-9)	41
8- ^{13}C -Tyramin	55,2	193	9 637	46,828 (C-16)	42
(R,S)-1- ^{13}C -Norcoclaurin	27,3	203	10 015	62,035 (C-9)	20
(R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin	22,4	153	13 991	62,050 (C-9)	20
(S)-N- $^{13}\text{CH}_3$ -Retikulin	57,1	205	11 169	42,120 (NCH ₃)	55

Tab. 3 Applikation von ^{13}C -markierten Vorstufen an Keimlinge von Papaver somniferum und Einbau in Thebain.

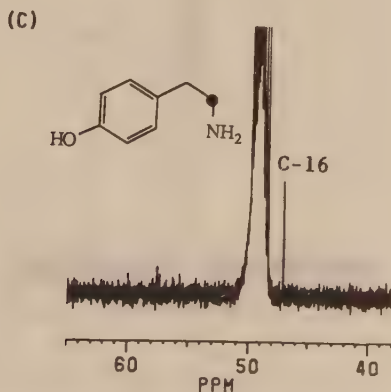
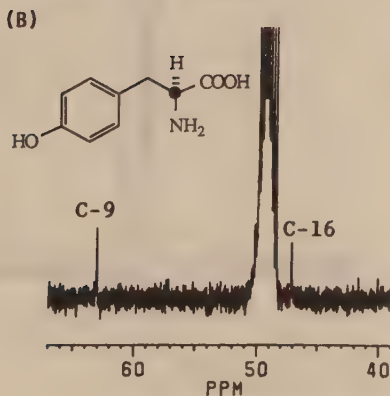
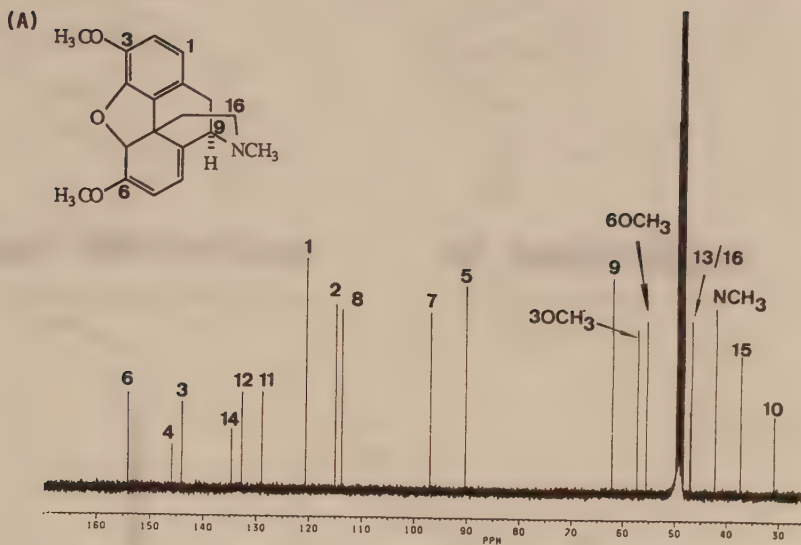


Abb. 13a (A) ^{13}C -NMR-Spektrum von unmarkiertem Thebain in CD_3OD ; (B)- (C) ^{13}C -NMR-Partialspektren von ^{13}C -markiertem Thebain nach einem L-2- ^{13}C -Tyrosin- (B) bzw. 8- ^{13}C -Tyraminfütterungsexperiment (C).

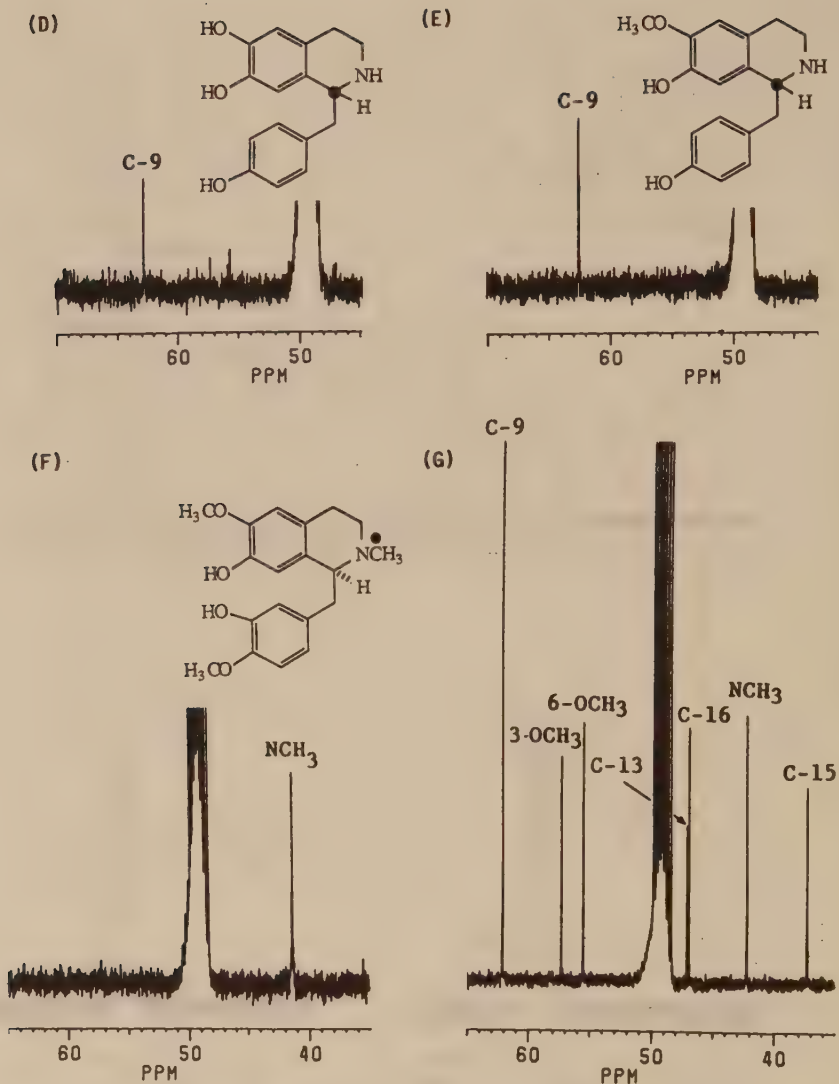


Abb. 13b (D)-(F) ^{13}C -NMR-Partialspektren von ^{13}C -markiertem Thebain nach Fütterungsexperimenten mit (R,S)-1- ^{13}C -Norcoclaurin (D), (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin (E), (S)-N- $^{13}\text{CH}_3$ -Retikulin (F); (G) Versuch (E) unter Zusatz von unmarkiertem Thebain.

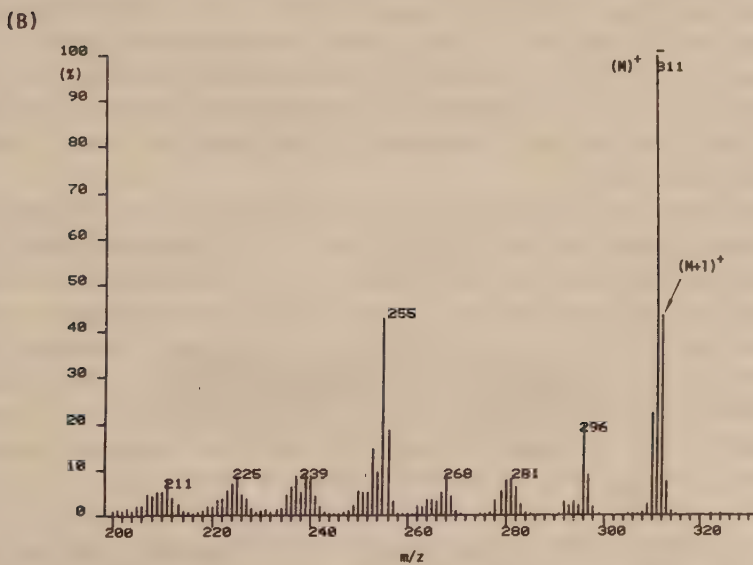
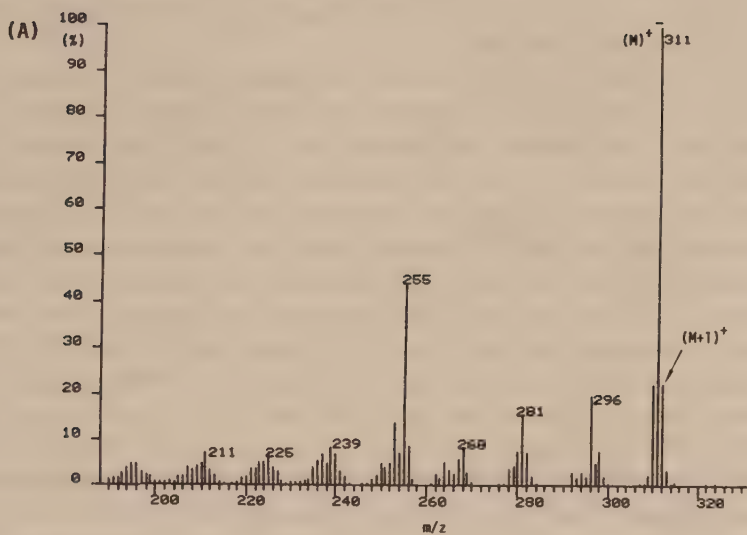


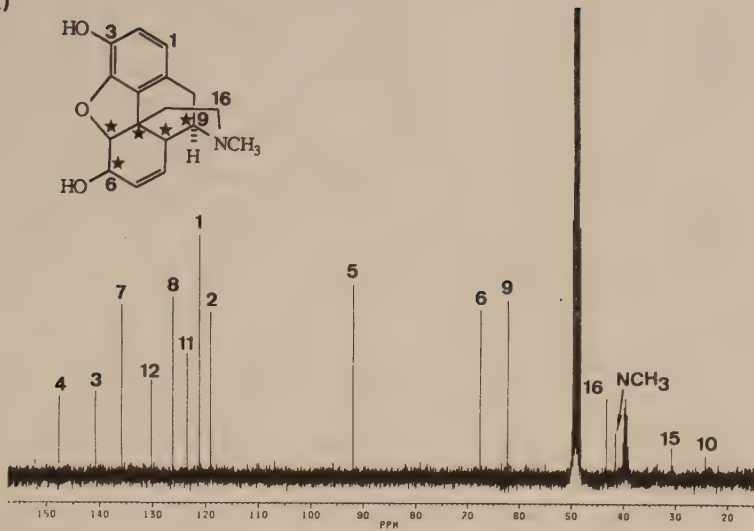
Abb. 14 EI-Massenspektren des Molekülionenbereiches von
 (A) unmarkiertem Thebain
 (B) ^{13}C -markiertem Thebain nach einer (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin-fütterung.

te, während alle anderen Signale die gleiche Intensität besaßen, wie die entsprechenden Peaks von unmarkierten Thebain (vgl. Abb. 13 G).

Der ^{13}C -Markierungsgrad des isolierten Thebains war bei beiden Fütterungsexperimenten deutlich geringer als bei den Versuchen mit markiertem Tyrosin und Tyramin. Da während der Applikationszeit eine starke Braunfärbung der Keimlingswurzeln beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 12), ist anzunehmen, daß 1-(R,S)- ^{13}C -Norcoclaurin und -Coclaurin teilweise oxidierten, was den niedrigen Markierungsgrad erklären würde. Aber auch eine ^{13}C -Anreicherung von nur 20% läßt sich im Massenspektrum noch deutlich erkennen: In Abb. 14 sind die beiden Partialspektren des Molekülionenbereichs von unmarkiertem Thebain und von ^{13}C -markiertem Thebain aus der (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurinfütterung dargestellt. Der (M+1) $^{+}$ -Peak des unmarkierten Thebains stammt von dem Gehalt an natürlich vorkommendem ^{13}C , von anderen Isotopenanteilen wie z.B. ^{15}N und von einem (M+H) $^{+}$ -Ion. Zur Berechnung des Markierungsgrades müssen die (M+1) $^{+}$ -Peaks beider Substanzen um diese drei Anteile korrigiert werden (genaue Berechnung s. II.8.3 A). Doch ist es auch möglich, die ungefähre ^{13}C -Anreicherung allein aufgrund der unterschiedlichen Höhen der (M+1) $^{+}$ -Peaks festzustellen.

Die Rolle von Retikulin als wichtige Vorstufe der Opiumalkaloide konnte ebenfalls mit einem ^{13}C -Fütterungsversuch bestätigt werden. (S)-N- $^{13}\text{CH}_3$ -Retikulin markierte die N-Methylgruppe von Thebain, wobei der Anreicherungsfaktor über 50% betrug. Das ist - ebenfalls wie die hohe Einbaurate bei den entsprechenden ^{14}C -Applikationsexperimenten - ein Beweis dafür, daß Retikulin im Biosyntheseweg Thebain viel näher steht, als alle anderen Vorstufen, die hier getestet wurden. Um zu zeigen, daß markiertes Coclaurin nicht nur in Thebain, sondern auch in Morphin eingebaut werden kann, wurde (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin an fünf-Wochen-alte Papaver somniferum-Pflanzen appliziert. In diesen war zuvor der Gehalt an Thebain, Codein und Morphin mittels des von WIECZOREK (1985)

(A)



(B)

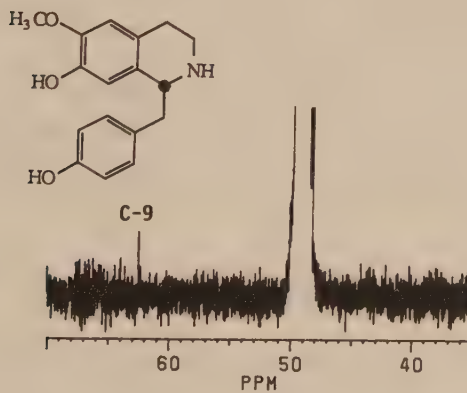


Abb. 15 (A) ^{13}C -NMR-Spektrum von unmarkiertem Morphin in CD_3OD unter Zusatz von etwas DMSO-d_6
 (B) ^{13}C -NMR-Partialspektrum von ^{13}C -markiertem Morphin nach einem Applikationsexperiment mit (R,S)-1- ^{13}C -Coclaurin.

aufgebauten Radioimmuntests bestimmt worden. Er betrug für Thebain 0,54 µg/Pflanze (19 µg/g TG), für Codein 3,38 µg/Pflanze (119 µg/g TG) und für Morphin 19,4 µg/Pflanze (685 µg/g TG). Es war also anzunehmen, daß markiertes Cocclaurin vor allem in Morphin inkorporiert werden müßte, da die Enzymsysteme, die die Biosyntheseschritte zum Morphin katalysieren, in diesen Pflanzen im Gegensatz zu den Keimlingen voll aktiviert sein sollten. Von Vorteil war auch, daß das im Fütterungsexperiment gebildete ^{13}C -Morphin nicht weiter metabolisiert werden konnte, sondern akkumulieren würde.

Wie unter II.8.2 B beschrieben wurden 18,7 µmol (R,S)-1- ^{13}C -Cocclaurin an fünf-Wochen-alte Papaver somniferum Pflanzen appliziert. Die Aufnahme durch das Wurzelsystem erfolgte wesentlich langsamer als bei den Keimlingen. Nach zwei Tagen wurden die Pflanzen aufgearbeitet und der Methanolextrakt dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. II.8.3 C). Der Gehalt an isoliertem Morphin wurde photometrisch (88 µg) und die Lage der Markierung im ^{13}C -NMR-Spektrum bestimmt. Wie im Vergleich mit dem voll zugeordneten ^{13}C -NMR-Spektrum von unmarkiertem Morphin zu erkennen ist, markierte (R,S)-1- ^{13}C -Cocclaurin die C-9-Position von Morphin (s. Abb. 15). Der Einbau in Morphin war also wie in Thebain ohne Veränderung des Kohlenstoffskeletts von Cocclaurin erfolgt. Die ^{13}C -Anreicherung betrug bei diesem Versuch nur 3%, was auf die schlechte Aufnahme der markierten Vorstufe zurückzuführen war.

1.3 Einbau 1- ^{13}C , 1- ^2H -markierter Vorstufen in Thebain

Applikationsexperimente mit den Enantiomeren von 1- ^{13}C , 1- ^2H -Norretikulin und -Retikulin sollten Hinweise liefern, ob der Einbau von (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin in Thebain wie von BATTERSBY et al. (1965a) vorgeschlagen über eine 1,2-Dehydrostufe abläuft. Dabei müßte im Gegensatz zu Fütterungsversuchen mit (R)-Enantiomeren bei den Vorstufen mit

(S)-Konfiguration das Deuterium am C-1-Atom, also am chiralen Zentrum ausgebaut werden, was im ^{13}C -NMR-Spektrum deutlich zu erkennen ist. Auf diese Weise könnte auch überprüft werden, ob bei der Metabolisierung der (S)-Enantiomere zu Thebain - wie von Battersby festgestellt - das Deuterium zu einem Teil erhalten bleibt oder vollständig ausgebaut wird. Ferner könnte der Beobachtung von Battersby nachgegangen werden, daß bei den (R)-Enantiomeren während ihrer Metabolisierung zu den Morphinalkaloiden ebenfalls ein bestimmter Prozentsatz der Markierung am C-1-Atom ausgebaut wird.

Die Applikationsexperimente, die anschließende Aufarbeitung und Reinigung erfolgten wie unter II.8.2 A bzw. II.8.3 A beschrieben. In Tabelle 4 wurden die Ergebnisse der vier Versuche zusammengefaßt. Dazu sind in Abb. 16 a und b die ^{13}C -NMR-Partialspektren von Thebain aus den (R)- und (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin- und (R)- und (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulinfütterungen und die zugehörigen CI-Partialmassenspektren dargestellt.

In den ^{13}C -NMR-Spektren von Thebain aus den (R)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin- und Retikulin-Fütterungsversuchen konnte kein ^{13}C -Signal im gewünschten oder umliegenden Bereich ermittelt werden. Das hatte folgenden meßtechnischen Grund: Wird der Wasserstoff am C-1-Atom von 1- ^{13}C -Norretikulin und -Retikulin durch Deuterium substituiert, so können diese 1- ^{13}C ,1- ^2H -Verbindungen aufgrund des Kernspins von Deuterium im ^1H -entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum nur noch als Triplettsichtbar gemacht werden, wobei die Intensität der Signale wegen der u.a. längeren Relaxationszeiten stark vermindert ist. Beim Ausbau des Deuterium wird die Signalmultiplizität aufgehoben, und das ^{13}C -Signal gewinnt sehr an Intensität (vgl. VEDERAS, 1987). Da jedoch die (R)-Enantiomere der applizierten Vorstufen bereits die mit Thebain übereinstimmende stereochemische Konfiguration am C-1-Atom besaßen, wurde bei ihnen beim Einbau in Thebain das Deuterium nicht ausgebaut. Die Markierung wäre höchstens als kleines Triplettsichtbar gewesen; dafür war jedoch zuwenig Substanz vorhanden.

appl. Vorstufe	appl. Menge (μmol)	Menge an isoliertem Thebain (μg)	Pulszahl	ermitteltes Signal (ppm)	^{13}C -Markierungs- grad (%)
(S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin	57	111	14 992	63,1664	26
(R)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin	57	132	10 341	*	34
(S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulin	57	161	17 161	63,1600	32
(R)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulin	57	113	9 902	*	38

* = Es konnte kein Signal im gewünschten oder umliegenden Bereich ermittelt werden.

Tab. 4 Einbau von 1- ^{13}C ,1- ^2H -markierten Vorstufen in Thebain

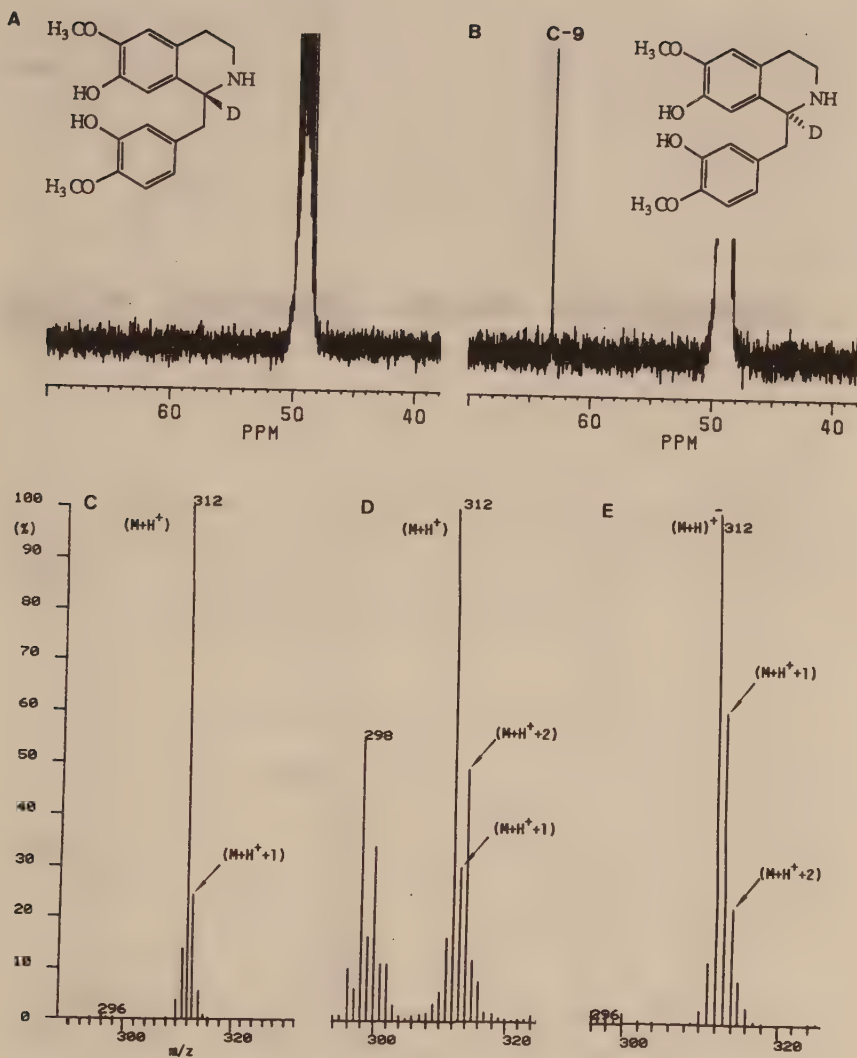


Abb. 16a ¹³C-NMR-Partialspektren von markiertem Thebain nach einem Applikationsexperiment mit (R)- bzw. (S)-1-¹³C,1-²H-Norretikulin (**A**) bzw. (**B**); CI-Partialmassenspektren von unmarkiertem Thebain (**C**) und markiertem Thebain nach einem (R)- bzw. (S)-1-¹³C,1-²H-Norretikulinfütterungsexperiment (**D**) bzw. (**E**).

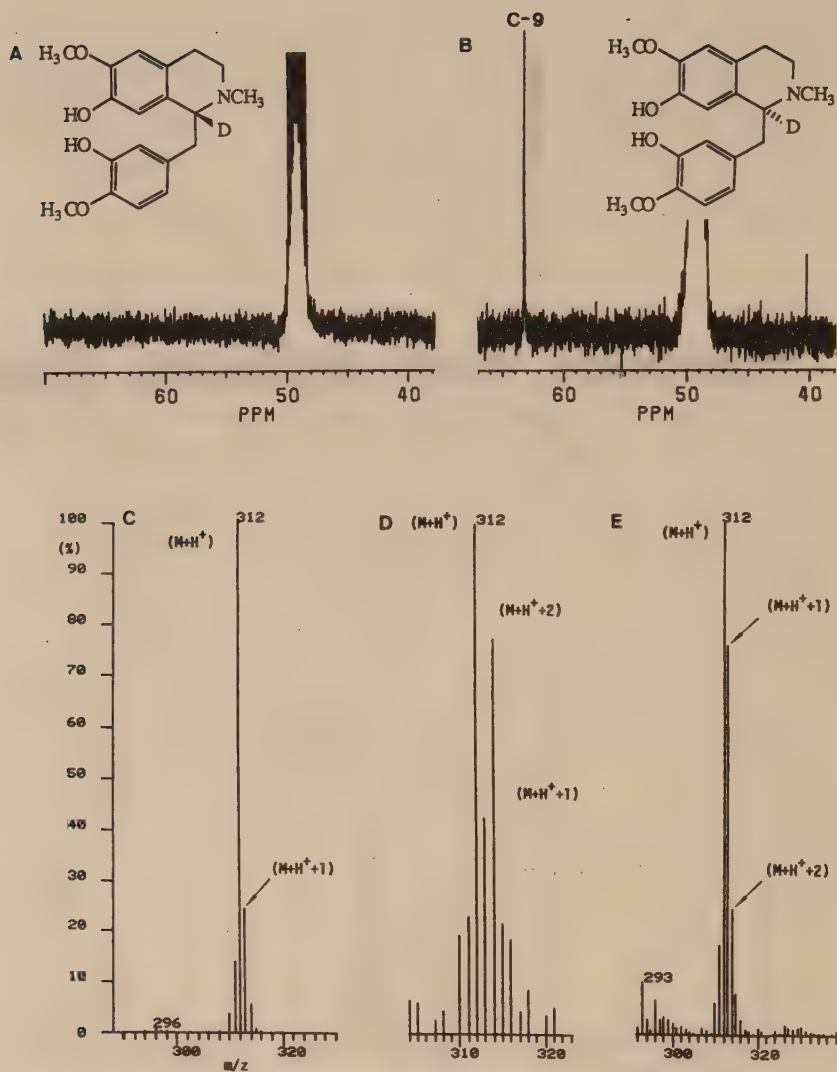


Abb. 16b ^{13}C -NMR-Partialspektren von markiertem Thebain nach einem Applikationsexperiment mit (R)- bzw. (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulin (A) bzw. (B); CI-Partialmassenspektren von unmarkiertem Thebain (C) und markiertem Thebain nach einem (R)- bzw. (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Retikulinfütterungsexperiment (D) bzw. (E).

Im Gegensatz dazu fand sich nach den Fütterungsversuchen mit (S)-1- ^{13}C ,1- ^2H -Norretikulin und -Retikulin ein Signal bei 63,16 ppm, was den Einbau in Thebain und die ^{13}C -Markierung der C-9-Position beweist. Dabei muß das Deuterium am C-1-Atom der verfütterten Vorstufen vollständig ausgebaut worden sein (im Rahmen der Meßgenauigkeit), da sonst kein Signal bzw. Triplett sichtbar gewesen wäre. Das ließ sich in CI-Massenspektren bestätigen: In Fütterungsversuchen mit doppelt markiertem (S)-Norretikulin und -Retikulin wurde ein großer ($\text{M}+\text{H}^++1$)- und ein kleiner ($\text{M}+\text{H}^++2$)-Peak registriert. Dagegen ist im Massenspektrum des Thebains, das aus Applikationsexperimenten mit den (R)-Enantiomeren isoliert worden war, der ($\text{M}+\text{H}^++2$)-Peak wesentlich höher als der ($\text{M}+\text{H}^++1$)-Peak. Daraus kann man schließen, daß beim Einbau von markiertem (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin in Thebain die entsprechenden (R)-Enantiomere über eine 1,2-Dehydroform gebildet werden müssen und daß dabei der Ausbau des Deuteriums am C-1-Atom erfolgt. Die (R)-Enantiomere werden dagegen ohne Konfigurationsumkehr inkorporiert.

2. Einbau von radioaktiv markiertem Cocclaurin in Stepharin

Von Fütterungsversuchen an Stephania glabra war bekannt, daß Cocclaurin in das Proaporphin (R)-Stepharin inkorporiert wird (BHAKUNI et al., 1983). Zur Stereospezifität dieser Umsetzung waren keine beweiskräftigen Angaben gemacht worden; es wurde lediglich vermutet, daß nur das (R)-Enantiomer von Cocclaurin die richtige Stereokonfiguration für eine Metabolisierung zu Stepharin besitzt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden (R)- und (S)-6- $^0\text{-}^{14}\text{CH}_3$ -Cocclaurin an Kalluskulturen von Tinospora cordifolia appliziert. Diese Zellkultur enthält - wie aus der Literatur bekannt ist - neben Protoberberinen vor allem das Proaporphin Stepharin (ARENS et al., 1984). Auf diese Weise sollte auch festgestellt werden, ob bei der Applikation von (S)-

Cocclaurin ebenfalls ein Einbau in Stepharin erfolgt, indem es - analog des von BATTERSBY et al. (1965a) für (S)-Retikulin postulierten Oxidations-Reduktions-Systems - über die Zwischenstufe 1,2-Dehydrococclaurin in (R)-Cocclaurin überführt wird.

Die Durchführung der Fütterungsexperimente - von beiden Enantiomeren waren jeweils 1 μCi (17 nmol) appliziert worden - erfolgte wie unter II.8.1 C, die Aufarbeitung der Kalli und die Reinigung von Stepharin wie unter II.8.3 B beschrieben. Dabei ergab sich, daß (S)-6- O^{14}CH_3 -Cocclaurin nicht zu Stepharin metabolisiert wurde. Die radioaktive Markierung fand sich dagegen vorwiegend in den Protoberberinen Jatrorrhizin und Palmatin wieder, doch wurde dieser Einbau nicht weiter untersucht.

Im Gegensatz dazu wurde (R)-6- O^{14}CH_3 -Cocclaurin mit einer Einbaurrate von 1,7% in Stepharin inkorporiert. Um die Identität des gebildeten radiomarkierten Stepharins zu überprüfen, wurde es durch intramolekulare Umlagerung in das Aporphin Tuduranin überführt (nach pers. Mitteilung von Dr. H. Arens, Köln): Das aus der (R)-6- O^{14}CH_3 -Cocclaurinfütterung isolierte Stepharin (23500 dpm) wurde mit einigen Tropfen 37%iger Salzsäure versetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Als Vergleich diente ein Ansatz mit 1 mg unmarkiertem Ste-

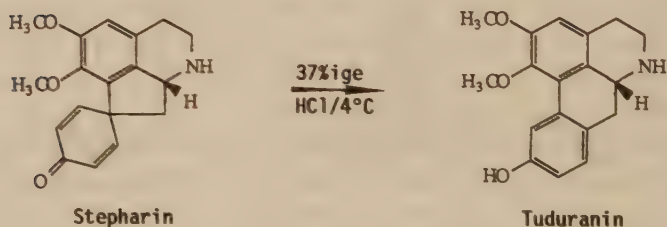


Abb. 17 Umsetzung von Stepharin zu Tuduranin

pharin. Beide Ansätze wurden nach 12 h unter Zusatz von 5 ml Methanol mehrmals in vacuo zur Trockne eingeengt und anschließend in LM 1 (s. II.12) chromatographiert. Sowohl unmarkiertes wie auch radiomarkiertes Stepharin waren vollständig umgesetzt worden, wobei die neu entstandene radioaktive Bande auf Höhe des unmarkierten Produktes lag (R_f -Wert Stepharin 0,43; Tuduranin 0,81). Durch Erstellung eines Massenspektrums konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei diesem Produkt um Tuduranin handelte.

MS(CI): ($M+H^+$) = 298 (100%); m/z = 297 (42%), 281 (15%), 256 (11%).

3. Taxonomische Verbreitung der Norcoclaurinsynthese

Wie bereits erwähnt, katalysiert die aus Eschscholtzia tenuifolia gereinigte (S)-Norlaudanosolinsynthese sowohl die Kondensation von Dopamin mit 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norlaudanosolin als auch die Kondensation von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norcoclaurin (RÜFFER et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1983). Ferner wird auch der unsubstituierte Phenylacetaldehyd von dem Enzym als Substrat akzeptiert.

Obwohl die K_M -Werte für den 3,4-Dihydroxy- und den 4-Hydroxyphenylacetaldehyd identisch sind, nannte man das Enzym (S)-Norlaudanosolinsynthese mit der Begründung, Norlaudanosolin sei die universelle Vorstufe der Benzyloisochinoline. Nachdem Applikationsexperimente nun aber gezeigt hatten, daß (S)-Coclaurin und damit auch (S)-Norcoclaurin zentrale Zwischenprodukte in der Biosynthese der Benzyloisochinoline sind, wird das Enzym in den nachfolgenden Untersuchungen über die enzymatisch katalysierte Bildung von Norcoclaurin Norcoclaurin-Synthase oder Dopamin:p-Hydroxyphenylacetaldehyd (Norcoclaurin) Synthase (E.C. 4.1.2.) benannt. In dieser Bezeichnung wird - im Gegensatz zur (S)-Norlaudanosolinsynthese - aus Gründen, die weiter unten erörtert werden sol-

len, auf eine Angabe zur Stereospezifität des Enzyms verzichtet.

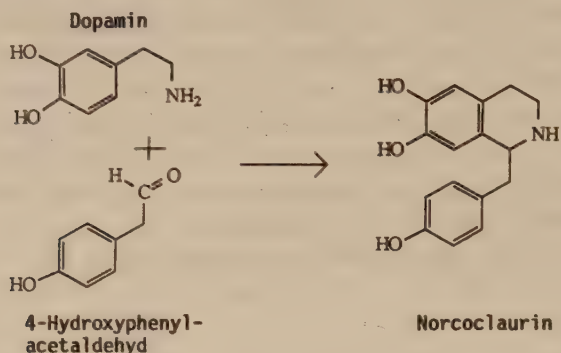


Abb. 18 Reaktion, die von der Norcocclaurinsynthase katalysiert wird.

Das Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es, einen Überblick über die taxonomische Verbreitung der Norcocclaurinsynthase zu gewinnen und daraus Schlüsse über ihre Bedeutung für die Biosynthese der Benzyloisochinoline zu ziehen. Zu diesem Zweck wurden Zellsuspensionskulturen verschiedener Pflanzenfamilien getestet, die für ihren Gehalt an Benzyloisochinolinalkaloiden bekannt waren. Zur Gewinnung von Enzympräparationen waren die Zellsuspensionskulturen 5 Tage lang unter den in II.1 angegebenen Bedingungen kultiviert und davon jeweils 10 g - wie in II.5.1 beschrieben - aufgeschlossen worden. Die Aktivität der Norcocclaurinsynthase wurde im Standardtest bestimmt (s. II.6.1). Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse.

Von den getesteten Kulturen war nur in einigen Vertretern aus der Familie der Papaveraceae und Berberidaceae Norcocclaurinsynthaseaktivität nachzuweisen, wobei die Enzymaktivität der Berberis-Arten im Vergleich zu derjenigen von Eschscholtzia lobbii jedoch äußerst gering war. Möglicherweise konnte die in vielen Kulturen vorhandene sehr schwache

Zellkultur	Enzymaktivität	
	pkat/mg Protein	nkat/l Medium
<u>Berberidaceae</u>		
- Berberis angulosa	1,8	0,2
- Berberis beaniana	0	0
- Berberis canadensis	0	0
- Berberis dictophylla	0	0
- Berberis gagnepainii	1,0	0,3
- Berberis henryana	0	0
- Berberis juliana	0	0
- Berberis koetieneana	0	0
- Berberis stolonifera V29	0	0
- Berberis taliensis	0	0
- Berberis turcomanica	1,2	0,6
- Berberis vulgaris	0	0
- Berberis wilsoniae	0	0
<u>Menispermaceae</u>		
- Tinospora cordifolia	0	0
<u>Papaveraceae</u>		
- Eschscholtzia lobbii	12,0	2,8
- Eschscholtzia tenuifolia	0	0
- Meconopsis cambrica	2,9	0,2
- Papaver somniferum/P049	20,0	2,3
- Papaver somniferum/P036	0	0
- Papaver somniferum/P012	0	0
- Papaver bracteatum	0	0
<u>Ranunculaceae</u>		
- Thalictrum tuberosum	0	0
- Coptis japonica	0	0
- Glaucium flavum	0	0

Tab. 5 Spezifische Enzymaktivitäten der Norcoclaurinsynthese in Rohextrakten verschiedener Zellsuspensionskulturen. Der Nachweis erfolgte im Standardtest.

Enzymaktivität mit dem hier verwendeten Tritiumausbautest nicht erfaßt werden. Eine andere Erklärung wäre, daß das Enzym in manchen Präparationen durch niedermolekuläre Stoffe gehemmt worden ist und deswegen nicht nachzuweisen war. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die aus Eschscholtzia lobbii und Berberis stolonifera gewonnenen Proteinrohextrakte im Verhältnis 1 : 1 gemischt und die Aktivität im Standardtest bestimmt. Ansätze mit den ungemischten Proteinextrakten dienten als Kontrollwerte. Die Enzymaktivität der Eschscholtzia lobbii-Präparation ließ sich nur um 10 % hemmen, was in weiteren Versuchen mit Proteinrohextrakten anderer Berberis-Arten bestätigt wurde. Demnach konnte eine Hemmung der Norcoclaurinsynthese als Grund für die schwache Enzymaktivität ausgeschlossen werden.

Neben Zellsuspensionskulturen wurden auch Kapseln und drei-Monate-alte Pflanzen von Papaver somniferum auf Norcoclaurinsyntheseaktivität untersucht. Der Aufschluß erfolgte wie unter II.5.2 beschrieben. In beiden Proteinextrakten konnte Aktivität gefunden werden. Sie betrug für die Ganzpflanze 9,9 pkat/mg (97 pkat/g TG) und für die Kapsel 1,8 pkat/mg (6 pkat/g TG). Dieses Ergebnis deutet auf eine Beziehung zwischen dem Vorkommen der Opiumalkaloide und der gemessenen Enzymaktivität hin.

In den hier getesteten pflanzlichen Geweben waren keine Untersuchungen zur Stereokonfiguration des durch Katalyse der Norcoclaurinsynthese entstandenen Produktes erfolgt. Da hierbei sowohl (S)-Norcoclaurin, analog der (S)-Norlaudanolsynthese, aber auch (R)-Norcoclaurin in Frage kommen, können zum jetzigen Zeitpunkt keine Angaben zur Stereochemie der von der Norcoclaurinsynthese katalysierten Reaktion gemacht werden.

Test auf die 6-O-Methyltransferase miterfaßt wurde. Da auch in anderen Geweben mit dem gleichzeitigen Auftreten einer N-Methyltransferase zu rechnen war und die Trennung von O- und N-Methyltransferasen aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften sehr schwierig ist (FRENZEL, 1987), wurde hier auf eine Reinigung der 6-O-Methyltransferase verzichtet.

Es sollten aber wenigstens Einblicke in die taxonomische Verbreitung der Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase gewonnen werden. Hierzu wurden Zellsuspensionskulturen aus vier verschiedenen benzylisochinolinhaltigen Pflanzenfamilien auf das Vorkommen dieser Enzymaktivität untersucht.

Zur Gewinnung der Enzympräparationen wurden jeweils 10 g der verwendeten Zellsuspensionskulturen - wie unter II.5.1 beschrieben - aufgeschlossen und die Aktivität im Standardtest bestimmt (s. II.6.2). Um zwischen O- und N-methylierten Produkten zu unterscheiden, wurde jeder Ansatz zusätzlich in LM 6 (s. II.12) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (R_f -Wert N-Methylnorcoclaurin 0,03, Norcoclaurin 0,11, Coclaurin 0,51, N-Methylcoclaurin 0,62). Die Radioaktivitätsverteilung wurde durch Integration am Dünnschichtscanner bestimmt. Auf diese Weise konnte berechnet werden, wieviel Prozent der im Zähltest erhaltenen Aktivität auf N-Methylnorcoclaurin, Coclaurin und N-Methylcoclaurin entfielen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 6 gezeigt.

Die Enzymaktivität der Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase fand sich bis auf den Proteinrohextrakt von Tinospora cordifolia in allen untersuchten Kulturen. Allerdings war das Enzym immer von einer N-methylierenden Aktivität begleitet, so daß bereits das Substrat Norcoclaurin zu N-Methylnorcoclaurin oder Coclaurin, das durch Katalyse der Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase entstanden war, weiter zu N-Methylcoclaurin umgesetzt wurden.

Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß die Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase zwischen Stereoisomeren nicht differenziert und ferner daß in Vertretern aus der Familie der Papaveraceae und Berberidaceae die höchsten Enzymaktivitäten

Zellkultur	Substrat	Enzymaktivität pkat/mg nkat/l Protein Medium	entstandene Produkte nach Radioaktivitäts- verteilung auf DC (%)			
			N-CH ₃ -Norcoc- laurin	Coclaurin	N-CH ₃ -Coclaurin	
<u>Fumariaceae</u>						
- <i>Corydalis vaginans</i>	(R)-Norcoclaurin (S)-Norcoclaurin	2,2 6,5	0,8 2,5	20 23	55 54	25 23
- <i>Dicentra spectabilis</i>	(R)- (S)-	0 1,3	0 0,5	0 0	0 64	0 36
- <i>Fumaria capreolata</i>	(R)- (S)-	1,4 2,9	0,4 0,8	20 25	45 38	35 37
<u>Menispermaceae</u>						
- <i>Cissampelos mucronata</i>	(R)- (S)-	0,4 1,5	0,1 0,3	0 18	0 47	0 35
- <i>Chondodendron tomentosum</i>	(R)- (S)-	1,0 1,8	0,2 0,4	29 21	45 52	26 27
- <i>Stephania japonica</i>	(R)- (S)-	12,4 17,6	0,5 0,7	7 56	67 29	26 15
- <i>Tinospora caffra</i>	(R)- (S)-	9,3 32,0	0,7 2,5	0 27	73 6	27 67
- <i>Tinospora cordifolia</i>	(R)- (S)-	0 14,9	0 1,6	0 0	0 0	0 100

<u>Zellkultur</u>	<u>Substrat</u>	<u>Enzymaktivität</u>	<u>entstandene Produkte nach Radioaktivitäts- verteilung auf DC (%)</u>		
		pkat/mg nkat/l Protein Medium	N-CH ₃ -Norcoc- laurin	Coclaurin	N-CH ₃ -Coclaurin
<u>Papaveraceae</u>					
- Argemone platyceras	(R)-Norcoclaurin (S)-Norcoclaurin	9,4 11,5	0,1 0,2	48 49	52 36
- Eschscholtzia lobbii	(R)- (S)-	0,9 3,6	0,1 0,4	0 46	56 33
- Meconopsis cambrica	(R)- (S)-	15,4 23,6	0,8 1,2	13 32	72 56
- Papaver somniferum/P049	(R)- (S)-	12,0 18,4	4,0 6,2	21 42	65 47
<u>Berberidaceae</u>					
- Berberis stolonifera	(R)- (S)-	22,5 33,1	3,3 4,8	9 11	70 8
- Berberis juliana	(R)- (S)-	2,0 9,4	0,6 2,8	0 36	78 5
- Berberis dictophylla	(R)- (S)-	7,2 9,0	1,3 1,6	22 12	68 32

Tab. 6 Spezifische Enzymaktivitäten der (R,S)-Norcoclaurin-6-O-Methyltransferase in Rohextrakten verschiedener Zellsuspensionskulturen.

(bezogen auf Liter Medium) gefunden wurden. Dieselben Eigenschaften konstatierten RÜFFER et al. (1983) bei der (R,S)-Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase. Zieht man noch die bereits erwähnte wenig ausgeprägte Substratspezifität dieses Enzyms in Betracht, so drängt sich die Vermutung auf, daß es sich bei der (R,S)-Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase und der (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase um ein und dasselbe Enzym handeln könnte.

5. Reinigung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase aus Zellsuspensionskultur von Tinospora cordifolia

Durch Katalyse der bisher beschriebenen Enzyme, der Norcocclaurinsynthase und (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase, kann (S)-Cocclaurin entstehen. Dieses Benzylisochinolinalkaloid erwies sich - wie bereits erwähnt - in Fütterungsexperimenten an Papaver somniferum-Keimlingen als Vorstufe der Opiumalkaloide. Demzufolge muß Cocclaurin auch eine Vorstufe von Retikulin darstellen, in das es durch Hydroxylierung, N- und O-Methylierung überführt werden kann. An dieser Stelle soll zuerst auf eine mögliche N-Methylierung eingegangen und die Frage nach der Reihenfolge der drei Enzyme vorerst noch außer acht gelassen werden.

Wie bei den Versuchen zur (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase gezeigt werden konnte, findet die enzymatisch katalysierte N-Methylierung von Cocclaurin in vielen pflanzlichen Zellkulturen statt. Dabei handelt es sich vorwiegend um nicht stereoselektive N-Methyltransferasen. Eine Ausnahme stellt die Suspensionskultur von Tinospora cordifolia dar, in der anscheinend eine (S)-stereoselektive Cocclaurin-N-Methyltransferase (SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase; E.C. 2.1.1.) vorhanden ist (vgl. Tab. 6). Da diese Kultur aufgrund der an ihr durchgeführten Applikationsexperimente (s. III.2) für Untersuchungen zur Biosynthese der Benzylisochinoline von erheblichen Interesse war und sich in diesem

Gewebe zudem keine 6-O-Methyltransferaseaktivität nachweisen ließ (vgl. Tab. 6), die im Enzymtest auf N-Methylierung miterfaßt werden kann, wurde die Cocclaurin-N-Methyltransferase aus Suspensionskulturen von Tinospora cordifolia gereinigt und charakterisiert.

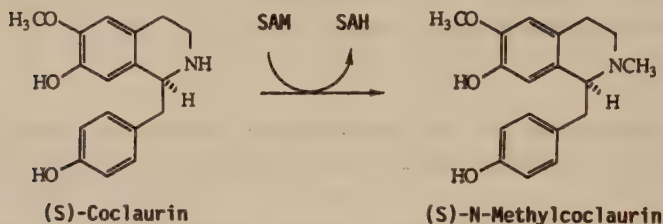


Abb. 20 Reaktion, die von der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase katalysiert wird.

5.1 Gewebeaufschluß

Die Herstellung eines Enzymrohextraktes aus Zellsuspensionskulturen von Tinospora cordifolia erfolgte wie unter II.5.1 beschrieben: 375 g nach 5 Tagen Kultivierungsdauer abgeerntetes und tiefgefrorenes Gewebe (16,1 g Trockengewicht) wurden in 750 ml Aufschlußpuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 7,5, Zusatz von 20 mM Mercaptoethanol) zu einem homogenen Brei gerührt, durch Mull gepreßt und 10 min bei 10000 g klar zentrifugiert. Der Überstand wurde im Eisbad einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen (40% Sättigung) und nach 10 minütigem Rühren ein zweites Mal abzentrifugiert. Da sich das Enzym als sehr salzempfindlich erwies, wurde auf eine zweite Ammoniumsulfatfällung verzichtet und der klare Überstand ohne weitere Verarbeitung für die Auftrennung an Phenylsopharosegelmaterial verwendet.

5.2 Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose

Die Trennung an Phenylsepharose beruht auf der Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ungeladenem Gelmaterial. Diese Wechselwirkungen können durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösungsmittels intensiviert werden. Bei Zugabe eines unpolaren Lösungsmittels kommt es in Abhängigkeit von der Stärke der hydrophoben Wechselwirkung zur selektiven Desorption der Proteine.

Zur Durchführung dieser Trennmethode wurden 920 ml Proteinrohextrakt (Proteingehalt 230 mg) mit einer Flußrate von 50 ml/h auf eine Phenylsepharose-Säule (2 cm $\varnothing$ x 15 cm) aufgegeben, die zuvor mit 40% Ammoniumsulfat in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol. Auf das Anlegen eines Gradienten wurde verzichtet, da das Enzym sonst - wie in Vorversuchen beobachtet - über das gesamte Gradientenvolumen von der Säule schmieren würde. Das Enzym konnte auf diese Weise zwar nur zweifach angereichert, aber dafür auf 16,5 ml konzentriert werden.

5.3 Gelfiltration an TSK-Fraktogel

Die Trennung durch Gelfiltration beruht auf der Fähigkeit von Makromolekülen, je nach ihrer Größe in definiert große Poren einer Matrix einzudringen. So werden kleinere Moleküle länger in der stationären Phase verweilen, während große Moleküle sehr schnell eluieren. Für die Reinigung von Enzymen ist diese Technik besonders geeignet, da meist keine direkten Wechselwirkungen zwischen Gelmatrix und Protein auftreten. Dadurch ist das Verfahren besonders schonend und ergibt hohe Aktivitätsausbeuten.

Zur Gelfiltration stand eine Säule mit TSK-Fractogel HW-55S zur Verfügung (3 cm $\varnothing$ x 47 cm), die mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol äquilibriert

war. Das Phenylsepharose-Eluat (16 ml, 104 mg Protein) wurde zur Erhöhung der Dichte mit Saccharose versetzt und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 15 ml/h, wobei 100 Fraktionen à 3 ml aufgefangen wurden. Abbildung 21 zeigt das charakteristische Elutionsprofil. Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration wurde analog

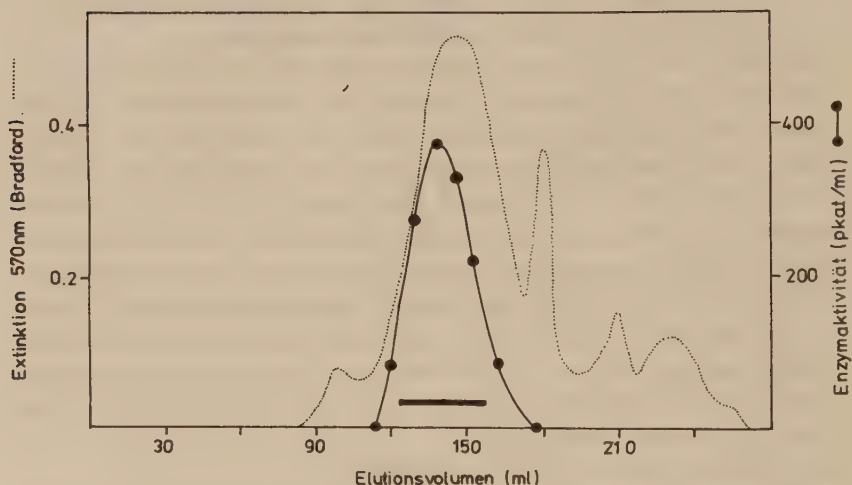


Abb. 21 Auftrennung einer vorgereinigten (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase-Präparation (16 ml, 104 mg Protein) an TSK-Fractogel. Säulenabmessung: 3 cm $\varnothing$ x 47 cm; Flußrate: 15 ml/h; Elutionsmittel: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 20 mM Mercaptoethanol; Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtest. Der durch den Balken gekennzeichnete Eluatbereich wird vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

II.10, der Nachweis auf (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase wie unter II.6.2 beschrieben durchgeführt.

Die Fraktionen 40 - 52 (33 ml) enthielten die N-Methyltransferase-Aktivität, die mit 100%iger Ausbeute wiedergefunden wurde.

5.4 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Das Material der Mono Q-Säule besteht aus einem Kunstharz, an das quarternäre Aminoethylgruppen gebunden sind. An diese positiv geladene Matrix adsorbieren die Proteine in Abhängigkeit ihrer Ladung. Ihre Affinität zum Säulenmaterial kann durch pH-Änderungen oder Zusatz von Puffern hoher Ionenstärke beeinflusst werden. So erfolgte in der unten beschriebenen Chromatographie die Desorption der Proteine durch Zugabe einer konzentrierten Kaliumchloridlösung. Die hohe Trennleistung der Mono Q-Säule ist bedingt durch das zu Kugeln geformte Gelmaterial. Alle Kugeln besitzen den gleichen Durchmesser von 9,8 μm 2% und ermöglichen so eine hervorragende Säulenpackung.

33 ml des TSK-Fractogelsäuleneluats (69,3 mg Protein) wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Mono Q-Säule (1,0 cm $\varnothing$ x 10 cm) aufgegeben, die zuvor mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol äquilibriert worden war. Zur Elution wurde ein KCl-Gradient (0 - 1 M KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol) über 50 ml angelegt. Das Auftragen des Proteins auf die Säule, die anschließende Elution und das Auffangen von 1 ml-Fraktionen erfolgte mit Hilfe einer programmierbaren FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (s. II.3).

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, fand sich die Aktivität der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase in den Fraktionen 70 - 75 (5,3 ml, 4,4 mg Protein). Obwohl 94% des Fremdproteins abgetrennt werden konnten, war die Anreicherung dieses Schrittes nur 5-fach. Grund dafür ist die bereits erwähnte starke Salzempfindlichkeit des Enzyms, die auch die sofortige Chromatographie des Mono Q-Säuleneluats an G25 (1,5 cm $\varnothing$ x 5 cm) erforderlich machte. Als Elutionsmittel fand hierbei 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 ohne Zusatz von Mercaptoethanol Verwendung. Auf diese Weise wurde die Probe entsalzt und gleichzeitig auf den für den nächsten Reinigungsschritt nötigen pH-Wert eingestellt.

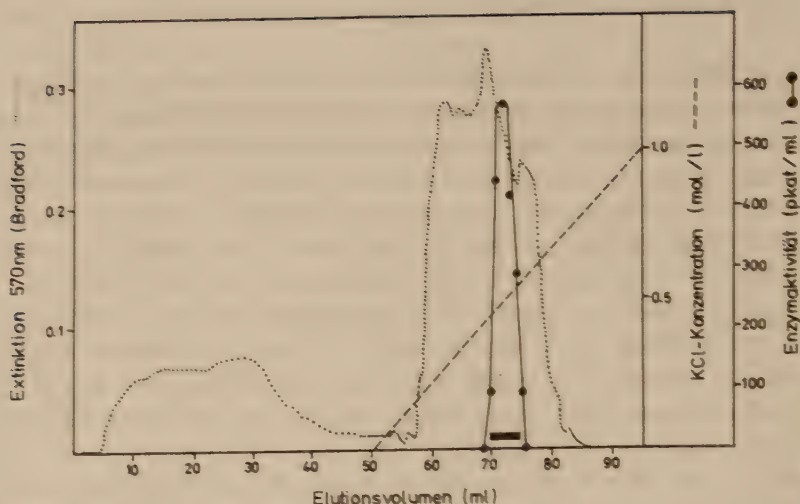


Abb. 22 Fraktionierung von vorgereinigter (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase (33 ml, 69 mg Protein) durch Ionenaustauschchromatographie an Mono Q. Säulenabmessung: 1,0 cm ϕ x 10 cm; Flußrate: 1 ml/min; Elution: linearer KCl-Gradient 0-1 M in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 20 mM Mercaptoethanol; Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtest. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wurde vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

5.5 Affinitätschromatographie an Cocclaurin-gekoppelter epoxyaktivierter Sepharose

Epoxyaktivierte Sepharose 6B besteht aus Sepharose 6B, an die über eine stabile Etherbrücke der hydrophile Spacer 1,4-bis-(2,3-Epoxypropoxy-)Butan gebunden ist. Die freien Oxiran-Gruppen können unter Ausbildung von Etherbindungen mit Hydroxylgruppen oder über Alkylaminverknüpfungen mit Liganden, die freie Aminogruppen besitzen, reagieren.

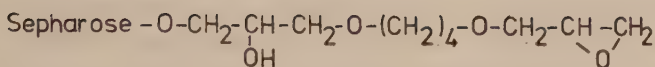


Abb. 23 Partialstruktur von epoxyaktivierter Sepharose 6B

Da Coclaurin sowohl freie Hydroxylgruppen wie auch ein sekundäres Amin besitzt, sollte versucht werden, dieses Benzylisochinolinalkaloid an epoxyaktivierte Sepharose zu koppeln. Mit Hilfe eines solchen Gelmaterials könnte die (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase spezifisch nach ihrer biologischen Funktion gereinigt werden.

Zur Herstellung des Affinitätsgels wurden 0,5 g epoxyaktivierte Sepharose 6B (entspricht 30 µmol freien Oxirangruppen) in 10 ml destilliertem Wasser gequollen und mit 100 ml dest. Wasser gewaschen. Nach Zugabe von 15 mg (R,S)-Coclaurin (47 µmol), das in 200 µl Dimethylsulfoxid und 300 µl Wasser gelöst war, wurde die Gelsuspension mit 10 µl 1M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 auf pH 9 eingestellt und ausreichend mit Stickstoff begast. Die Kopplung erfolgte unter leichten Schütteln in einem auf 35°C erwärmten Wasserbad (Gerät der Firma GFL, Burgwedel). Nach 18 h wurde das Gel, das sich gelblich verfärbt hatte, wechselweise mit 0,1 M Citratpuffer pH 3,0, 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 (Zusatz von 40% Dimethylsulfoxid) und Wasser gewaschen. Um verbliebene freie Oxirangruppen zu blockieren, wurde das Gel mit 1 M Ethanolamin über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der oben beschriebene Waschvorgang. Das Gel (1,5 ml) wurde in eine Pasteurpipette gefüllt und mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 äquilibriert. Dieser Puffer hatte sich in Vorversuchen als vorteilhaft erwiesen, da das Enzym bei einem pH-Wert über 7,5 nicht mehr an das Gel bindet.

Um die Affinitätssäule nicht zu überladen, wurde das entsalzte Mono-Q-Säuleneluat nicht auf einmal, sondern in drei

Schritten à 2 ml (je 1,4 mg Protein) aufgegeben und aufgetrennt. Die Flußrate betrug zur Proteinaufgabe 4 ml/h, wurde jedoch zum Nachwaschen auf 8 ml/h gesteigert. Die Elution erfolgte mit einem KCl-Stufengradienten (0 - 200 mM KCl und 200 - 500 mM KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5; Volumen pro Stufe 7,5 ml). In die Fraktionen (1 ml) wurden jeweils 50 µl 1M Natriumcarbonatpuffer pH 9,0 vorgelegt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, eluierte das Enzym in der Gradientenstufe zwischen 200 und 500 mM Kaliumchlorid. Aus den drei Reinigungen konnten 0,7 mg Protein (10 ml) mit einer dreifachen Anreicherung gewonnen werden. Für den folgenden elektrophoretischen Reinigungsschritt wurde die ver-

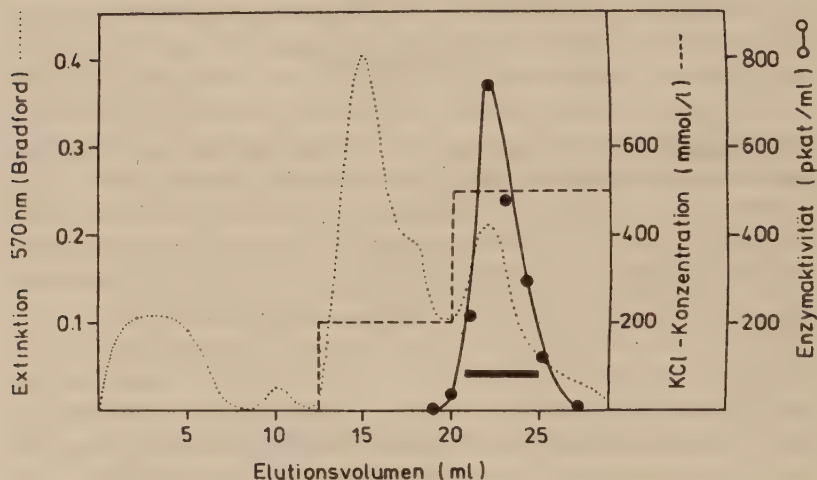


Abb. 24 Fraktionierung von vorgereinigter (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase (2 ml, 1,4 mg Protein) durch Affinitätschromatographie an Coclaurin-gekoppelter epoxyaktivierter Sepharose. Säulenvolumen: 1,5 ml (Pasteurpipette); Flußrate: 4 ml/h; Elution: KCl-Stufengradient (0-200 mM und 200-500 mM KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5); Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtest. Der durch den Balken gekennzeichnete Eluatbereich wurde vereinigt und für die weitere Reinigung verwendet.

einigten Eluate durch Chromatographie an G25 entsalzt (vgl. III.5.4).

Eine Reinheitsüberprüfung im SDS-Gel ergab, daß in dem Eluat der Affinitätssäule noch zahlreiche Fremdproteine enthalten waren. Deswegen ist nicht auszuschließen, daß das Enzym nicht nur an den Coclaurin-Liganden, sondern aufgrund unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen auch an die Gelmatrix gebunden hatte.

5.6 Präparative Diskelektrophorese im Polyacrylamidgel

Der abschließende Reinigungsschritt stellte eine präparative diskontinuierliche Elektrophorese dar, deren Prinzip in den unterschiedlichen pH-Werten und Vernetzungsgraden von Sammel- und Trenngel besteht. Die Proteine, die sich im Sammelgel zu einer scharfen Bande konzentrieren, zeigen im Trenngel je nach ihrer Größe und Nettoladung verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten und werden dadurch voneinander getrennt.

Das Eluat der Affinitätssäule (10 ml, 0,7 mg Protein) wurde zur Dichteerhöhung mit Saccharose und zur Markierung der Front mit Bromphenolblau versetzt und in einem präparativen Flachgel elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.9.2; 7,5% Acrylamid; 12 h bei 20 mA; Laufstrecke 11 cm). Das Gel wurde bis auf einen Randstreifen in 1,0 cm breite Streifen segmentiert, welche einige Stunden in jeweils 5 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 bei 4°C extrahiert wurden. Zum Nachweis der Enzymaktivität wurden die Gelstückchen durch Watte abfiltriert und 100 µl des Filtrats in den Standardtest eingesetzt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde der Randstreifen analog II.9.2 gefärbt.

In Abb. 25 sind die Verteilung der Enzymaktivität und die angefärbten Proteinbanden schematisch dargestellt. Die Enzymaktivität ließ sich nicht einer bestimmten Proteinbande zuordnen. Hierfür sind verschiedene Ursachen denkbar. Einer könnte sein, daß sich das Enzym im Gel nicht spezifisch

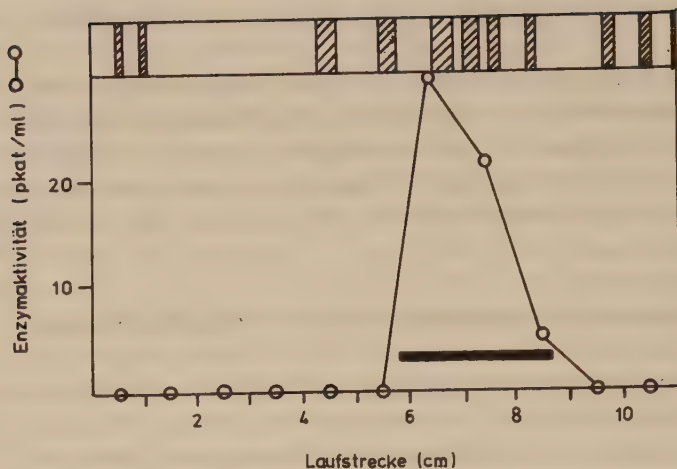


Abb. 25 Elektrophoretische Auftrennung von vorgereinigter (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase (10 ml, 0,7 mg Protein) in 7,5%igem Polyacrylamidgel. Laufstrecke: 11 cm; Dauer: 12 h/20 mA; Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtest; Anfärbung der Proteinbanden nach II.9.2. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wird für die Charakterisierung des Enzyms verwendet.

nachweisen ließ, sondern mit Hilfe der oben genannten Segmentiertechnik lokalisiert werden mußte. Möglich wäre aber auch, daß von der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase multiple Enzymformen existieren. Diese Frage wurde allerdings nicht weiter verfolgt.

Der in Abb. 25 gekennzeichnete Eluatbereich wurde vereinigt und für die Charakterisierung der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase verwendet.

5.7 Zusammenfassende Darstellung der Reinigung und Anreicherung

Mit dem beschriebenen Reinigungsverfahren wurde eine 115-fache Anreicherung der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Gesamt- Protein (mg)	spez. Aktivität (pkat/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung (x-fach)
Rohextrakt	830	21,9	382	57,5	100	1
Überstand der 40%- Ammoniumsulfatfällung	920	19,2	230	83,6	88	1,5
Phenylsepharose-Eluat	16,5	16,2	104	155,6	74	2,7
TSK-Fraktogel-Eluat	33,0	16,4	69,3	237,9	74	4,1
Mono Q-Eluat	5,5	5,9	4,4	1333,8	27	23,2
Affinitätsigel-Eluat	10,0	3,0	0,7	4196,7	14	73,0
Disk-Elektrophorese- Eluat	17,0	2,0	0,3	6600,0	9	114,8

Tab. 7 Anreicherung der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase aus Zellsuspensionskultur von Tinospora cordifolia.

erreicht. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die einzelnen Reinigungsschritte, die zu einer Abtrennung von 99,9% der ursprünglichen Proteinmenge führten. Die Aktivitätsausbeute betrug am Ende nur 9%. Grund dafür ist wieder die große Salzempfindlichkeit des Enzyms, was besonders bei der Ionenaustauschchromatographie an Mono Q deutlich wird. In diesem einen Schritt war die Aktivitätsausbeute um beinahe 50% gesunken.

Zur Beurteilung der Reinheit des Enzyms wurde das Eluat nach Disk-Elektrophorese in einem 12,5%igem SDS-Gel aufgetrennt (s. II.9.2). Nach Anfärbung waren noch mindestens 6 Proteinbanden zu erkennen. Dies ist nicht sehr verwunderlich, da schon bei Anfärbung des Disk-Elektrophoressegels vier Banden auf Höhe der nachgewiesenen Enzymaktivität sichtbar waren (vgl. Abb. 25). Auf eine weitere Reinigung der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase wurde wegen der bereits so niedrig liegenden Aktivitätsausbeute verzichtet.

6. Charakterisierung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase

6.1 Identifizierung des Enzymproduktes

Die im Standardtest mit dem Substrat (S)-Cocclaurin gemessene Enzymaktivität läßt keine genaue Aussage über die Identität des entstandenen Produktes zu. Zur Charakterisierung eines Enzyms ist jedoch die eindeutige Identifizierung der durch enzymatische Katalyse gebildeten Produkte unerläßlich. Aus diesem Grund wurde die von der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase katalysierte Methylgruppenübertragung näher untersucht.

A. Nachweis mit Massenspektrometrie

Um genügend Substanz für die Aufnahme eines Massenspektrums zu erhalten, wurde ein präparativer Enzymansatz ohne radio-

markiertes SAM hergestellt. Er enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 ml 50 mmol Ascorbat, 50 mmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 3 μmol SAM, 2,5 μmol (S)-Cocclaurin und 207 pkat (0,03 mg Protein) 115-fach angereichertes Enzym. Nach dreistündiger Inkubation bei 30°C wurde der Ansatz mit 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 auf pH 9 eingestellt und erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in vacuo eingeengt (40°C) und in LM 6 (s. II.12) chromatographisch aufgetrennt. Die bei 254 nm sichtbare Bande auf Höhe von N-Methylcocclaurin wurde mit Methanol eluiert.

Von dem vermuteten N-Methylcocclaurin (MG 299) wurde ein Massenspektrum mit chemischer Ionisation aufgenommen (s. II.13). Bei der Auswertung eines CI-Spektrums muß beachtet werden, daß bei dieser Technik über eine Ionisierung des Reaktand-Gases ein Proton auf das zu messende Molekül übertragen wird, wodurch dessen Masse um eine Einheit zunimmt. Da bei m/z 300 der $(M+H^+)$ -Peak gefunden wurde (rel. Int. 100%), beträgt das Molekulargewicht des Enzymproduktes folglich 299. Dies beweist, daß nur eine Methylgruppe in das Substrat Cocclaurin (MG 285) eingeführt worden war. Das Isochinolinfragment m/z 192 (7%) und das Benzylfragment m/z 107 (4%) zeigten ferner, daß diese Methylierung am Stickstoff oder in der 7-O-Stellung des Isochinolinteils stattgefunden hatte. Um die genaue Position der Methylgruppe festzulegen, wurde im folgenden Experiment versucht, das Enzymprodukt enzymatisch nachzuweisen.

B. Enzymatischer Nachweis

Zu diesem Zweck mußte zuerst ^{14}C -markiertes Enzymprodukt dargestellt werden: Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 500 μl 100 nmol (S)-Cocclaurin, 80 nmol (5 μCi) $^{14}\text{CH}_3$ -SAM, 50 μmol Kaliumphosphatpuffer, 50 μmol Ascorbat und 20 pkat 115-fach angereichertes Enzym (3 μg Protein). Nach zweistündiger Inkubation wurde der Ansatz wie unter A. beschrieben aufgearbeitet und gereinigt. Dem in 10 μl Wasser

gelösten Enzymprodukt (1 μCi , 16 nmol) wurden 20 nmol SAM, 50 nmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 50 nmol Ascorbat und 1 μkat einer aus Berberis koetianeana Suspensionskultur 18-fach angereicherten N-Methyltransferase zugesetzt (Enzymaktivität bezogen auf (R)-Coclaurin). Als Vergleich diente ein Ansatz mit 20 nmol (R,S)-Norarmepavin (= 7-O-Methylcoclaurin) und 1 μCi (16 nmol) $^{14}\text{CH}_3$ -SAM. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze in LM 6 (s. II.12) chromatographiert und die Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner ausgewertet. Die nicht stereoselektive N-Methyltransferase, die mir freundlicherweise Herr Dr. T. Frenzel zur Verfügung gestellt hatte, katalysierte zwar im Vergleichsansatz die Umsetzung von Norarmepavin zu Armepavin, das radiomarkierte Enzymprodukt jedoch wurde nicht methyliert. Damit war nachgewiesen, daß es sich bei dem durch Katalyse der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase gebildeten Enzymprodukt nicht um Norarmepavin, sondern nur um N-Methylcoclaurin gehandelt hatte. Dieses konnte von einer N-Methyltransferase nicht weiter umgesetzt werden.

C. Chromatographischer Nachweis

Zur Bestätigung der unter A. und B. gefundenen Ergebnisse wurden ein Teil des ^{14}C -markierten Enzymproduktes (s. B.) und unmarkierte Vergleichsubstanzen in LM 4 und LM 13 (s. II.12) chromatographiert. Beide Laufmittel erlaubten die Trennung von Norarmepavin und N-Methylcoclaurin. Die radioaktiv markierte Bande lag stets auf Höhe der Vergleichsubstanzen N-Methylcoclaurin.

R_f -Werte für LM 4 und LM 13 (Werte in Klammern): Coclaurin 0,26 (0,62), N-Methylcoclaurin 0,32 (0,34), Norarmepavin 0,40 (0,55).

6.2 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Molekulargewichtsbestimmung eines Enzyms stehen in unserem Labor zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die SDS-Gelelek-

trophorese und die Gelfiltration an geeichten Säulen. Für eine Analyse auf dem SDS-Gel ist es notwendig, daß das Enzym homogen oder zumindest mit keinen Fremdproteinen mit ähnlichem Molekulargewicht verunreinigt ist. Da dies bei der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase nicht der Fall war, erfolgte die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.

Dazu wurden an einer mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol äquilibrierten Sephadex G-100

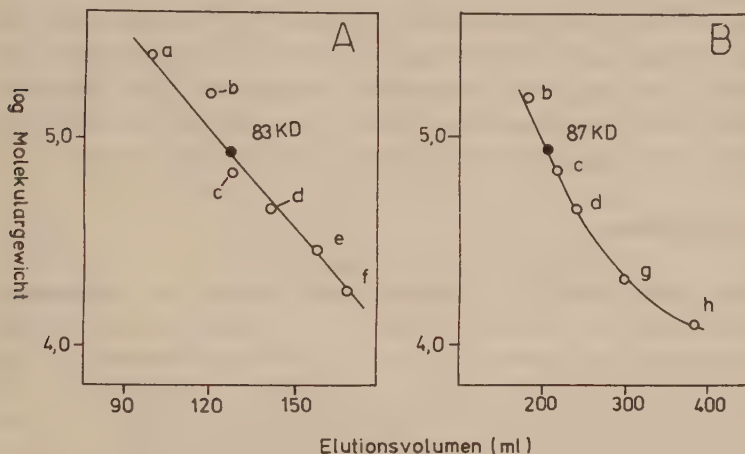


Abb. 26 Bestimmung des Molekulargewichts der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase durch Gelpermeations-HPLC (A) und Gelfiltration (B).

(A) Gelpermeations-HPLC an TSK G 3000 SW-Säule (2,15 cm ϕ x 60 cm): Auftrennung von 13,5 mg (3,2 nkat) vorgereinigter (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase. Als Eichproteine dienten Katalase (a, 240 kD), Aldolase (b, 158 kD), Rinderserumalbumin (c, 67 kD), Ovalbumin (d, 45 kD), Carboanhydrase (e, 29 kD), Myoglobin (f, 17,8 kD).

(B) Gelfiltration an Sephadex G-100-Säule (2,5 cm ϕ x 109 cm): Auftrennung von 7,5 mg (1,8 nkat) vorgereinigter (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase. Als Eichproteine dienten: b-d siehe (A), Trypsin-Inhibitor (g, 20,1 kD), Cytochrom C (h, 12,5 kD).

●: (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase mit ermitteltem Molekulargewicht.

Säule (2,5 cm $\varnothing$ x 109 cm) 1 ml des vorgereinigten Enzyms (7,5 mg Protein, 1,8 nkat) mit einer Flußrate von 12 ml/h aufgetrennt. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Eichproteinen. Es ergab sich für die (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase ein Molekulargewicht von 87000 Dalton.

Ein ähnliches Resultat wurde mit Gelpermeationschromatographie an einem HPLC-System der Firma LKB (s. II.3) erzielt. Dazu waren 1,8 ml vorgereinigte N-Methyltransferase (13,5 mg Protein, 3,2 nkat) mit einer Flußrate von 3 ml/min über eine geeichte TSK G 3000 SW-Säule (2,15 cm $\varnothing$ x 60 cm) gepumpt und in 3ml-Fractionen aufgefangen worden. Als Elutionsmittel diente 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 und 25 mM Natriumchlorid. Durch Vergleich mit den K_{AV} -Werten der Eichproteine wurde ein Molekulargewicht von 83000 Dalton ermittelt.

6.3 pH-Optimum

Die Enzymaktivität ist abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Denn einerseits kann sich mit dem pH-Wert der Dissoziationsgrad der Aminosäuren des Enzyms und andererseits das Protonierungsmuster der Substrate ändern. Durch beides kann die Reaktivität des Enzyms stark beeinflußt werden.

Die pH-Abhängigkeit der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase ist in Abbildung 27 dargestellt. Es wurden dazu im Standardtest jeweils 6,8 pkat (5,1 μ g Protein) 23-fach angereichertes Enzym und 50 μ mol der in Abb. 27 angeführten Puffer eingesetzt. Vor der Inkubation wurde der pH-Wert der Ansätze mit einer Glaselektrode gemessen (s. II.3). Das pH-Optimum der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase lag bei 8,6. Dies entspricht einem Zusatz von 50 μ mol Triethanolamin-Puffer pH 9,0. Da das Substrat SAM im alkalischen Milieu nicht stabil ist, wurden nur die Bestimmung des Temperaturoptimums, der Substratspezifität und der Stereoselektivität bei diesem pH-Wert durchgeführt.

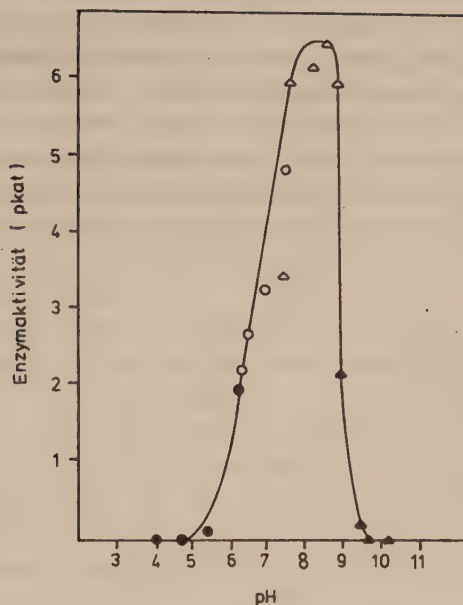


Abb. 27 pH-Abhängigkeit der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase. Je 6,8 pkat (5,1 µg Protein) 23-fach angereichertes Enzym wurden unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 50 µmol folgender Puffer inkubiert: ●● Citrat/Phosphat, ○○ Kaliumphosphat, △△ Triethanolamin, ▲▲ Natriumcarbonat.

6.4 Temperaturoptimum

Neben dem pH-Wert des Inkubationsansatzes ist die Aktivität eines Biokatalysators abhängig von der Temperatur. Um das für jedes Enzym charakteristische Temperaturoptimum zu ermitteln, muß die Temperatur bestimmt werden, bei der eine optimale enzymatische Umsatzrate erzielt werden kann, und die noch nicht zu einer Denaturierung und damit Inaktivierung des Enzyms führt.

Die Temperaturabhängigkeit der von der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase katalysierten Reaktion ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Ansätze wurden unter Standardbedingungen mit jeweils 1,2 pkat (0,9 μg Protein) 23-fach angereichertem Enzym bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Der im Standardtest verwendete Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 war für diesen Zweck durch Triethanolamin-Puffer pH 9,0 (50 μmol /Ansatz) ersetzt worden (s. oben). Der optimale Temperaturbe-

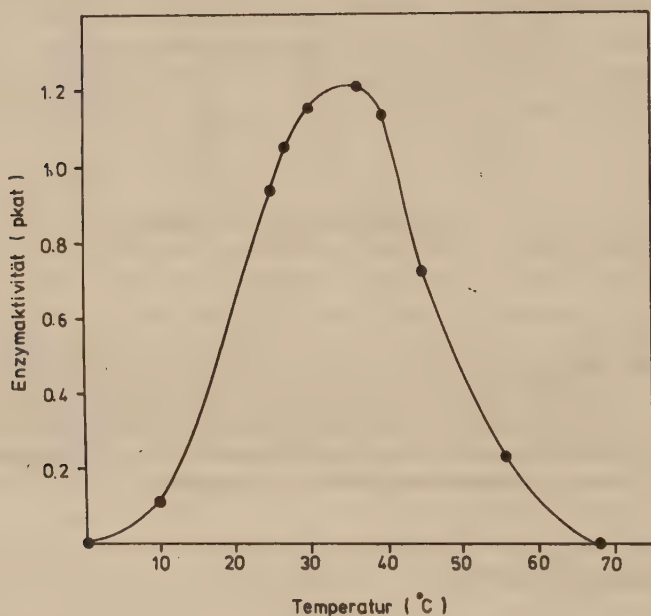


Abb. 28 Temperaturabhängigkeit der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase. Je 1,2 pkat (0,9 μg Protein) 23-fach-angereichertes Enzym wurden im Standardtest bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als Puffer diente pro Ansatz 50 μmol Triethanolamin-puffer pH 9,0.

reich lag für die Aktivität der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase zwischen 34 und 37°C. Für alle weiteren enzymatischen Bestimmungen wird jedoch wegen thermischer Instabilität der Substrate und Produkte die Inkubationstemperatur von 30°C beibehalten.

Bei der Auftragung nach Arrhenius konnte im Temperaturbereich zwischen 15 und 30°C für die von der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase katalysierte Reaktion ein Q_{10} -Wert von 2,07 und eine Aktivierungsenergie von 54 kJ/mol ermittelt werden (SEGEL, 1975).

6.5 Substratspezifität und Stereoselektivität

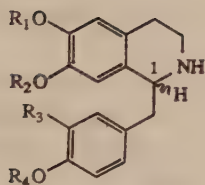
Die Bestimmung der Substratspezifität und Stereoselektivität eines Enzyms ist ein wichtiges Kriterium für seine Charakterisierung. Der Vergleich der Umsatzraten, die mit verschiedenen Substraten erzielt werden können, liefert Hinweise auf die Stellung des Enzyms im Biosyntheseweg und möglicherweise auch auf die Reihenfolge enzymatisch katalysierter Umsetzungen.

Bereits bei den Untersuchungen zur (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase war aufgefallen (vgl. Tab. 6), daß die N-Methyltransferase aus Zellsuspensionskultur von Tinospora cordifolia nur das (S)-Enantiomer von Cocclaurin katalytisch umsetzt. Um mehr an Information über die Stereoselektivität und Substratspezifität des Enzyms zu erhalten, wurden 20 nmol der Stereoisomere verschiedener Benzylisochinoline mit 3 pkat (9,5 µg Protein) des 115-fach angereicherten Enzyms 1/2 h bei 30°C inkubiert. Von einigen Substanzen mußte das Razemat eingesetzt werden, da die Enantiomere einzeln nicht zur Verfügung standen. Bis auf den Zusatz von 50 µmol Triethanolamin-Puffer pH 9,0 erfolgte die Durchführung der Tests unter Standardbedingungen. Zur Kontrolle wurden die Ansätze mit den Substraten (S)- und (R)-Cocclaurin, (S)- und (R)-Norcocclaurin, (R,S)-Isococclaurin, (R,S)-Norarmepavin, (S)- und (R)-Tetrahydropapaverin und (S)- und (R)-Norretiku-

lin in LM 6 chromatographiert (R_f -Werte s. III.4). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Von allen untersuchten Substraten wurden nur (S)-Cocclaurin und (S)-Norcocclaurin in die entsprechenden N-Methylderivate überführt. Die Enzymaktivitäten, die für (S)-Norretikulin und (R,S)-4'-O-Methylnorlaudanolin gefunden wurden, sind wahrscheinlich durch Spuren von Verunreinigung in diesen Substanzen bedingt. Wird Cocclaurin in der 7-O-Position methyliert oder das Substitutionsmuster des C-Rings verändert, so ist die enzymatische Umsetzung nicht mehr möglich. Das Vorhandensein der Methylgruppe in 6-O-Stellung scheint dagegen keine unbedingt notwendige Voraussetzung für Enzymaktivität zu sein, obwohl bei (S)-Cocclaurin eine 12fach bessere Umsatzrate beobachtet wurde als bei (S)-Demethylcocclaurin (= Norcocclaurin). Neben der Substratspezifität ist auch die Stereoselektivität sehr ausgeprägt. So zeigen (R)-Cocclaurin und (R)-Norcocclaurin im Gegensatz zu ihren (S)-Enantiomeren keine Metabolisierung. Selbst nach 12-stündiger Inkubation ließ sich in Ansätzen mit den (R)-Enantiomeren als Substrat keine Produktbildung feststellen. Aus diesem Grund und wegen der ausgeprägten Substratspezifität wurde das Enzym als (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase (SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase, E.C. 2.1.1.) bezeichnet.

Neben der Ermittlung der Umsatzraten von verschiedenen Substraten stellte die Bestimmung der K_M -Werte eine zweite Möglichkeit dar, um die Affinität des Enzyms zu den Substraten zu beurteilen. Da es sich bei der hier untersuchten N-Methylierung um eine Zwei-Substrat-Reaktion handelte, war die K_M -Wert-Bestimmung nur unter gewissen Voraussetzungen durchführbar: Eines der beiden Substrate mußte in einer Konzentration vorliegen, die seinen K_M -Wert weit überstieg (BERGMEYER, 1977). Es war jedoch nicht möglich, die Konzentration von dem Substrat SAM auf das 10-20fache seines K_M -Wertes (44 μ M) zu erhöhen, da SAM in der Reaktion die zu messende Größe darstellte. Maximal konnten 50 nmol SAM (200 μ M) eingesetzt werden. Ferner wurde darauf geachtet, daß



1H = α = (S)

1H = β = (R)



Dopamin

Substrat	Umsatzrate (%)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(S)-Cocclaurin	100	CH ₃	H	H	H
(R)-Cocclaurin	0	CH ₃	H	H	H
(S)-Norcocclaurin	8,3	H	H	H	H
(R)-Norcocclaurin	0	H	H	H	H
(R,S)-Isococclaurin	0	H	CH ₃	H	H
(R,S)-Norarmepavin	0	CH ₃	CH ₃	H	H
(S)-Norlaudanosolin	0	H	H	OH	H
(R)-Norlaudanosolin	0	H	H	OH	H
(S)-6-O-Methylnorlaudanosolin	0	CH ₃	H	OH	H
(R)-6-O-Methylnorlaudanosolin	0	CH ₃	H	OH	H
(R,S)-7-O-Methylnorlaudanosolin	0	H	CH ₃	OH	H
(R,S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	0,7	H	H	OH	CH ₃
(S)-Norretikulin	0,6	CH ₃	H	OH	CH ₃
(R)-Norretikulin	0	CH ₃	H	OH	CH ₃
(R,S)-Norprotosinomenin	0	H	CH ₃	OH	CH ₃
(R,S)-Nororientalin	0	CH ₃	H	OCH ₃	H
(R,S)-Norisoorientalin	0	H	CH ₃	OCH ₃	H
(S)-Tetrahydropapaverin	0	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
(R)-Tetrahydropapaverin	0	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
Dopamin	0				

Tab.8 Zusammenstellung der Substanzen, die als Substrate der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase getestet wurden. Die Ansätze enthielten 20 nmol Substrat, 50 μ mol Triethanolaminpuffer pH 9,0, 3 pkat (9,5 μ g Protein) 155-fach angereichertes Enzym. Der Test wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Umsatzraten sind auf (S)-Cocclaurin bezogen.

während der Reaktionszeit höchstens ein 5%iger Umsatz erzielt wurde.

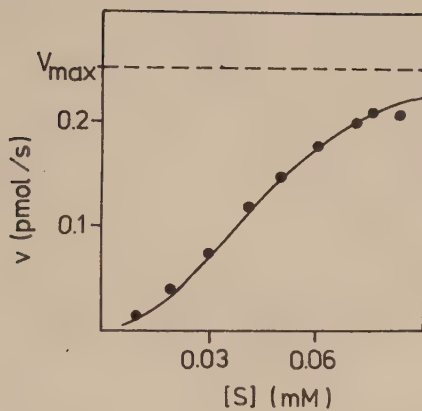
Zur Bestimmung des K_M -Wertes von (S)-Cocclaurin wurden die Ansätze mit 1,3 pkat (0,2 μ g Protein) 115-fach angereichertem Enzym bei pH 8,6 (50 μ mol Triethanolamin-Puffer pH 9,0) 1/2h bei 30°C inkubiert (vgl. Standardtest II.6.2). Die Konzentrationen von (S)-Cocclaurin variierten zwischen 2 und 20 nmol (8 - 80 μ M).

Bei der Auftragung nach MICHAELIS und MENTEN (1913) ergab sich nicht die normale Sättigungskurve, sondern eine sigmoide Linie. In dem nach LINEWEAVER und BURK (1934) transformierten Koordinatensystem streckte sich diese Linie nicht zu einer Geraden, sondern zeigte einen nach oben gekrümmten Verlauf. Dies deutete auf einen positiv kooperativen Effekt und damit auf ein allosterisches Enzym hin. Um den K_M -Wert zu bestimmen, mußte die Linweaver-Burk-Auftragung linearisiert werden. Hierzu wurde die x-Achse mit $1/(S)^n$ statt mit $1/(S)$ skaliert. Der Koeffizient n, auch als Hill-Koeffizient bezeichnet, gibt die Zahl der gleichzeitig an das Protein bindenden identischen Ligandenmoleküle an. Er kann bestimmt werden, indem $\log (v/(V_{\max}-v))$ gegen $\log (S)$ aufgetragen wird. Die maximale Steigung dieser gleichfalls sigmoiden Kurve entspricht dem Koeffizienten n (BISSWANGER, 1979).

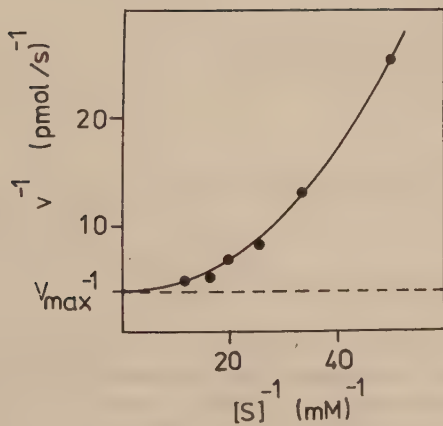
In Abbildung 29 ist die Linearisierung der Linweaver-Burk-Auftragung und die Ermittlung des K_M -Wertes für (S)-Cocclaurin über Extrapolation dargestellt. Danach betrug er 36 μ mol/l. Dieses Ergebnis kann jedoch aufgrund möglicher Meßfehler und der manuellen graphischen Auswertung nur als Näherungswert angesehen werden. Gleiches gilt für den Hill-Koeffizienten, der mit 2,6 bestimmt wurde. Neben Meßungenauigkeiten erklärt sich diese nicht gerade Zahl aber auch damit, daß maximale Kooperativität nie erreicht wird und die Zahl an tatsächlich vorhandenen Bindungsstellen über die Hill-Auftragung nicht ermittelt werden kann.

Die K_M -Wertbestimmung von (S)-Norcocclaurin verlief in glei-

A



B



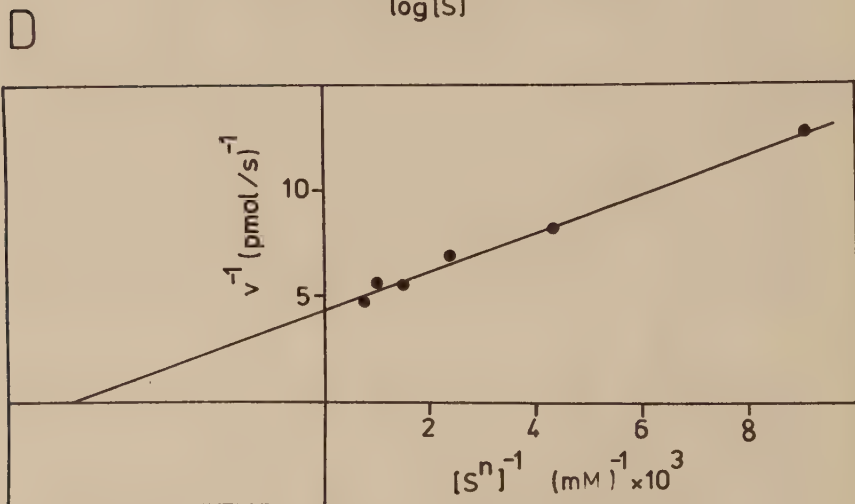
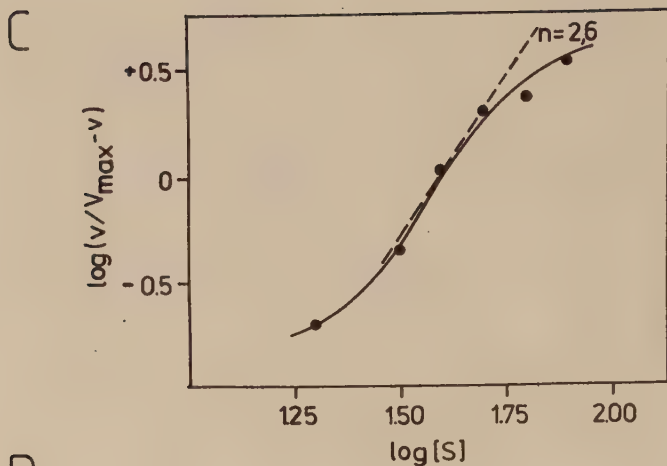


Abb. 29 Bestimmung des K_M -Wertes der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase für (S)-Cocclaurin. Bedingungen: 200 μM SAM, 1,3 μkat Enzym, pH 8,6, 30 °C. Auftragung nach MICHAELIS und MENTEN (1913) (A), Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) (B) mit Bestimmung von $V_{\max}$ durch Extrapolation, Hill-Auftragung (C) mit Bestimmung des Hill-Koeffizienten, linearisierte Lineweaver-Burk-Auftragung (D). Hill-Koeffizient: 2,6; K_m -Wert: 36 μM .

cher Weise wie die von (S)-Cocclaurin, da hier ebenfalls ein positiv kooperativer Effekt festgestellt wurde. Die Testansätze entsprachen denjenigen von (S)-Cocclaurin mit der Ausnahme, daß 7,5 pkat (1,1 µg Protein) Enzym eingesetzt wurden. Nach Hill-Auftragung und linearisiertem Linweaver-Burk-Diagramm wurde ein Hill-Koeffizient von 2,5 und ein K_M -Wert für (S)-Norcocclaurin, von 52 µmol/l ermittelt.

Die K_M -Wertbestimmung für SAM bereitete keine Schwierigkeiten. Zum einen konnte in diesem Fall die geforderte sättigende Konzentration an (S)-Cocclaurin eingesetzt werden (1 mM) und zum anderen wurde kein positiv kooperativer Effekt beobachtet. Die Ansätze enthielten jeweils 0,7 pkat (0,1 µg Protein) 155-fach angereichertes Enzym, 50 µmol Triethanolamin-Puffer pH 9,0 und SAM-Konzentrationen zwischen 16 und 400 µM. Die Durchführung des Tests erfolgte unter Standardbedingungen. Aus der Auftragung nach Linweaver und Burk ließ sich ein K_M -Wert von 44 µmol/l ableiten. Auf eine Bestimmung von V_{max} wurde hier ebenso wie in den beiden anderen Fällen verzichtet, da das Enzym nicht homogen war.

6.6 Kompetitive Hemmung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase durch SAH

Die (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe vom Cosubstrat SAM auf (S)-Cocclaurin. Dabei entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), das wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit mit SAM als Inhibitor von Methyltransferasen bekannt ist (ZAPPIA et al., 1969). Es handelt sich dabei um eine kompetitive Hemmung, die durch Erhöhung der SAM-Konzentration wieder aufgehoben werden kann.

Zur Bestimmung der Inhibitorkonstante wurde die Umsatzrate der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase in drei MeBreihen bei konstanter Substrat- und varrierter Inhibitor-Konzentration im Standardtest (s. II.6.2; 50 µmol Triethanolaminpuffer pH

9.0 und 3.3 pkat 115-fach angereichertes Enzym) ermittelt:

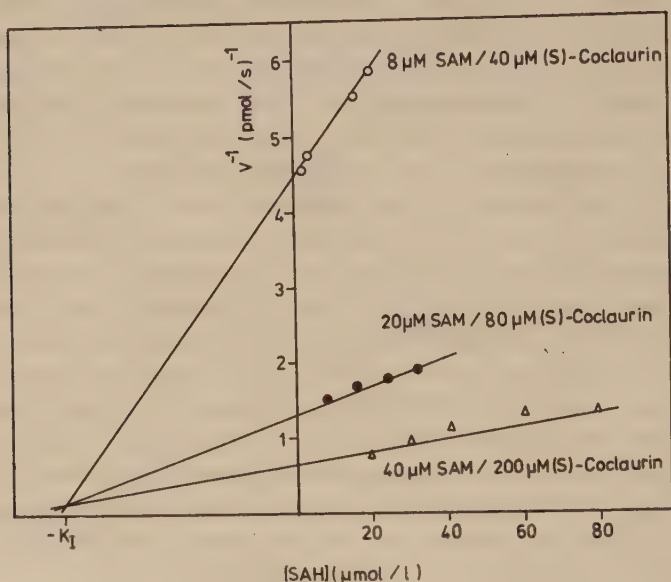


Abb. 30 Bestimmung des K_I -Wertes der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase für SAH. Bedingungen: 3,3 pkat Enzym (0,5 μg Protein), pH 8,6 (50 μmol Triethanolaminpuffer pH 9,0), 30 °C, konstante SAM- und (S)-Cocclaurin-Konzentrationen, variierte SAH-Konzentrationen. Auftragung nach DIXON (1953). K_I -Wert für SAH: 62 $\mu\text{mol/l}$.

1. Meßreihe: 40 μM (S)-Cocclaurin/ 8 μM SAM/ 0-20 μM SAH.
 2. Meßreihe: 80 μM (S)-Cocclaurin/ 20 μM SAM/ 0-40 μM SAH.
 3. Meßreihe: 0.2 mM (S)-Cocclaurin/ 40 μM SAM/ 0-0.1 mM SAH.
- Die Meßwerte wurden nach der Darstellung von DIXON (1953) reziprok gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Es ergab sich für jede Substratkonzentration eine eigene Gerade. Wie es bei einer kompetitiven Hemmung der Fall ist, schnitten sich diese Geraden im zweiten Quadranten. Der Schnittpunkt entspricht dem K_I -Wert, der für SAH 62 $\mu\text{mol/l}$ betrug.

6.7 Taxonomische Verbreitung von Cocclaurin-N-methylierender Enzymaktivität

Um einen Überblick über die taxonomische Verbreitung der Cocclaurin-N-methylierenden Enzymaktivität zu gewinnen, wurden 42 Suspensionskulturen von Pflanzen aus 7 verschiedenen Familien getestet. Diese waren 5 Tage lang unter den in II.1 angegebenen Bedingungen kultiviert und - wie unter II.5.1 beschrieben - aufgeschlossen worden. Die Aktivität der Cocclaurin-N-Methyltransferase wurde mit den Substraten (R)- und (S)-Cocclaurin im Standardtest bestimmt (vgl. II.6.2).

Im Enzymtest auf Cocclaurin-N-methylierende Aktivität werden neben (R)- und (S)-Cocclaurin auch alle Enzymprodukte anderer Methyltransferasen erfaßt. Um nun alle aus Cocclaurin entstehenden Metaboliten qualitativ zu ermitteln, wurde deswegen die katalytische Aktivität der Proteinrohextrakte zusätzlich mittels zweidimensionaler Chromatographie und anschließender Autoradiographie untersucht. Für diesen Zweck waren Testansätze mit je 5 µmol Ascorbat, 5 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 25 nmol (R)- bzw. (S)-Cocclaurin, 0,06 µCi $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$ (1,2 nmol) und bis zu 0,5 mg Protein hergestellt worden. Das Gesamtvolumen betrug 80 µl, die Inkubationszeit 2 h (30°C). Jeweils 20 µl der Ansätze wurden in LM 12 (vgl. II.12; 1. Dimension) und LM 1 (2. Dimension) zweidimensional chromatographiert und anschließend auf Röntgenfilme exponiert. Nach 14 Tagen erfolgte die Auswertung der Autoradiogramme.

Aus Tabelle 9 geht hervor, daß fast alle getesteten Kulturen eine Cocclaurin-N-methylierende Enzymaktivität enthielten. Das enzymatisch gebildete Produkt wurde dabei durch Vergleich der Schwärzung auf den Autoradiogrammen mit der Lage von Referenzsubstanzen als N-Methylcocclaurin identifiziert. Zusätzlich weitere Metaboliten ließen sich ebenfalls mit Hilfe der Autoradiogramme in den Ansätzen mit Proteinrohextrakten aus Berberis henryana-, Berberis wilsoniae-, Tinospora caffra- und Thalictrum tuberosum-Suspensionskultur

Zellkultur	<u>(S)-Cocclaurin</u>		<u>(R)-Cocclaurin</u>	
	Enzymaktivität		Enzymaktivität	
	pkat/mg Protein	nkcat/l Medium	pkat/mg Protein	nkcat/l Medium
<u>Berberidaceae</u>				
Berberis angulosa	1,8	0	9,2	0,1
Berberis beaniana	3,2	0,9	1,0	0,3
Berberis canadensis	34,0	2,6	34,0	3,4
Berberis carminea	3,0	0,4	0,4	0,1
Berberis circumserrata	1,0	1,1	0,7	0,8
Berberis hannaniensis	13,0	0,3	24,6	0,6
Berberis henryana *	3,5	1,7	2,2	1,0
Berberis julianae	8,7	1,9	13,0	2,9
Berberis koetaneana	35,0	5,5	34,0	5,4
Berberis stolonifera V29	13,4	4,9	9,0	3,3
Berberis wilsoniae *	7,4	2,4	0,9	0,3
<u>Fumariaceae</u>				
Corydalis vaginans	11,9	2,9	2,2	0,5
Dicentra spectabilis	1,6	0,5	0	0
Fumaria capreolata	3,1	0,9	1,3	0,4
Fumaria officinalis	1,6	0,4	1,1	0,3

Zellkultur	(S)-Coclaurin		(R)-Coclaurin	
	Enzymaktivität		Enzymaktivität	
	pkat/mg Protein	nkat/l Medium	pkat/mg Protein	nkat/l Medium
<u>Menispermaceae</u>				
<i>Chasmanthera dependens</i>	33,3	1,3	0,8	0
<i>Chondodendron tomentosum</i>	10,0	1,9	0,7	0,1
<i>Cissampelos mucronata</i>	16,9	1,6	0,3	0
<i>Cocculus trilobus</i>	12,8	0,8	0	0
<i>Stephania delavayi</i>	17,8	1,2	0	0
<i>Stephania japonica</i>	53,9	0,2	1,3	0
<i>Stephania ptereri</i>	14,5	3,7	0	0
<i>Tinospora caffra</i> *	39,2	6,1	1,3	0,2
<i>Tinospora cordifolia</i>	59,8	13,0	0	0
<i>Tinospora fragosa</i>	51,6	7,4	0,8	0,1
<u>Papaveraceae</u>				
<i>Bocconia cordata</i>	12,5	2,9	1,9	0,4
<i>Eschscholtzia californica</i>	20,8	2,7	13,0	1,7
<i>Eschscholtzia lobbi</i>	0,7	0,4	0,9	0,4
<i>Glaucium flavum</i>	7,5	0,5	2,1	0,1
<i>Meconopsis cambrica</i>	0	0	0	0
<i>Papaver somniferum</i> P049	13,3	1,1	1,7	0,2

Zellkultur	<u>(S)-Coclaurin</u>		<u>(R)-Coclaurin</u>	
	Enzymaktivität		Enzymaktivität	
	pkat/mg Protein	nkat/l Medium	pkat/mg Protein	nkat/l Medium
<u>Ranunculaceae</u>				
Ranunculus flammula	0	0	0	0
Thalictrum contortum	0,4	0	0	0
Thalictrum dasycarpum	11,1	2,7	2,3	0,6
Thalictrum dipterocarpum	11,0	2,8	1,7	0,5
Thalictrum flavum	5,0	0,3	0	0
Thalictrum glaucum	10,9	1,8	1,7	0,3
Thalictrum minus	0	0	0	0
Thalictrum tuberosum *	15,0	3,3	3,5	0,8
<u>Apocynaceae</u>				
Catharanthus roseus	0	0	0	0
Rauwolfia mannii	0	0	0	0
<u>Solanaceae</u>				
Nicotiana tabacum	0	0	0	0

Tab. 9 Vorkommen der Coclaurin-N-methylierenden Enzymaktivität in Zellsuspensionskulturen.

Der Nachweis erfolgte im Standardtest, unterstützt durch zweidimensionale Chromatographie und anschließender autoradiographischer Detektion.

* Außer N-Methylcoclaurin wurden weitere Metaboliten gefunden.

nachweisen.

Die Kulturen mit den höchsten Enzymaktivitäten (bezogen auf nkat/l Medium) fanden sich in der Familie der Menispermaceae. Herausragend war dabei mit 13 nkat/l Medium die Suspensionskultur von Tinospora cordifolia, von der - wie bei den bisherigen Versuchen - nur ein Enantiomer, nämlich das (S)-Coclaurin zum entsprechenden N-methylierten Produkt katalytisch umgesetzt wurde. Auch weitere Vertreter aus der Familie der Menispermaceae, wie z.B. Stephania pierreri oder Cocculus trilobus, schienen keine (R)-Coclaurin-N-methylierende Enzymaktivität zu enthalten. Von den Proteinrohextrakten der übrigen Suspensionskulturen wurden dagegen beide Enantiomere umgesetzt. Allerdings wurden nur in wenigen Fällen für (R)- und (S)-Coclaurin dieselben Umsatzraten gemessen (z.B. bei Berberis koetaneana oder Fumaria officinalis). Meistens erfolgte die Metabolisierung des (S)-Enantiomers wesentlich besser als die von (R)-Coclaurin, was besonders bei den Vertretern aus den Familien der Ranunculaceae und Papaveraceae auffiel. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von (S)-Coclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin als zentrale Zwischenprodukte in der Biosynthese der Benzylisochinoline sein.

Keinerlei Enzymaktivität ließ sich in Kulturen, für die keine Benzylisochinoline als Inhaltsstoffe bekannt sind, nachweisen (Catharanthus roseus, Rauwolfia mannii, Nicotiana tabacum).

6.8 Kinetik der Bildung der SAM:(S)-Coclaurin N-Methyltransferase in Tinospora cordifolia

Die Suspensionskultur von Tinospora cordifolia hatte sich als geeignetste Quelle zur Isolierung und Reinigung der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase erwiesen (vgl. III.5 und II.6.7). Da neben der Auswahl des Gewebes auch die Ermittlung des günstigsten Erntezeitpunkts entscheidend ist, wurde die Zu- und Abnahme der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferaseak-

tivität in Suspensionskultur von Tinospora cordifolia über einen Zeitraum von zwei Wochen verfolgt.

Zu diesem Zweck waren 30 300-ml-Erlenmeyer-Kolben, die jeweils 75 ml B5C2-Medium enthielten, mit je 5 g (FG) Zellmaterial inokuliert und unter Standardbedingungen kultiviert worden (s. II.1). Nach jedem bzw. jedem zweiten Tag wurden jeweils zwei Kolben abgeerntet. Ein Aliquot des Gewebes diente zur Bestimmung des Trockengewichts. Aus dem anderen Teil der tiefgefrorenen Zellen erfolgten die Gewinnung der Enzympräparationen wie unter II.5.1 und die Bestimmung der Enzymaktivität wie unter II.6.2 beschrieben.

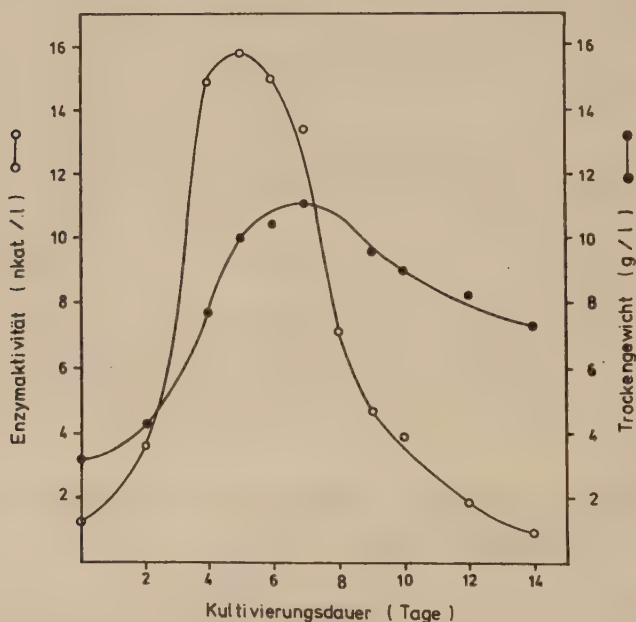


Abb. 31 Kinetik der Trockengewichtszunahme und der Aktivität der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase in Suspensionskultur von Tinospora cordifolia. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen sind in Abb. 31 dargestellt. Die Enzymaktivität der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase erreicht zwischen dem 4. und 6. Tag der Kultivierungsdauer ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt auch der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Als optimaler Erntezeitpunkt wurde deswegen der 5. Tag gewählt.

6.9 Immobilisierung der SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase

Eine Möglichkeit, Biokatalysatoren zu immobilisieren, besteht darin, größere Mengen Enzym an ein inertes Trägermaterial zu binden. Dadurch wird das Enzym in eine unlösliche und reaktionsraumbegrenzte Form gebracht. Es kann wie freies, lösliches Enzym für präparative Umsetzungen verwendet werden, mit dem Vorteil, daß sich die immobilisierte Form leicht aus dem Reaktionsmedium abtrennen läßt. So wird ein wiederholter und kontinuierlicher Einsatz des immobilisierten Enzyms möglich (HARTMEIER, 1985).

Aus diesem Grund sollte auch die (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase in präparativ benötigten Mengen immobilisiert werden. Als Verfahren wurde dazu die Immobilisierung an Glaskugeln gewählt (WEETALL, 1976). Das Prinzip dieser Art der Immobilisierung beruht darauf, daß die Glaskugeln mit einer Aminosilanschicht überzogen werden, an die zugesetzter Glutardialdehyd unter Ausbildung von Schiff'schen Basen bindet. Verbliebene freie Aldehydgruppen der Glasmatrix können danach mit den Aminogruppen von Proteinen reagieren. Die Glaskugeln (3 g CPG-10, 120-200 mesh) wurden zur Silanisierung in 60 ml Wasser suspendiert, mit 600 µl Aminopropyltriethoxysilan (Sigma) versetzt und der pH-Wert der Lösung mit 6N HCl auf 3 eingestellt. Nach zweistündiger Inkubation bei 75°C wurde das Glas abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 100°C getrocknet. 3 g des silanisierten Glases wurden mit 75 ml 2,5%igem Glutaraldehyd (in 10 mM Kaliumphosphat-

puffer pH 7,5) 90 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei sich das Glas orangebraun färbte. Zur Entfernung von überschüssigem Aldehyd mußte anschließend gründlich mit Wasser gespült werden.

Der zu bindende, katalytisch aktive Proteinrohextrakt (98 mg Protein, 94 pkat/mg, 39 ml) war zuvor aus 200 g Gewebe von Tinospora cordifolia durch Aufschluß, Ammoniumsulfatfällung (70% Sättigung) und Chromatographie an G25 gewonnen worden (vgl. II.5.1). Die Inkubation mit dem oben präparierten Glas erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach Abtrennen des Überstandes, dessen Proteingehalt zur Berechnung des gebundenen Proteins bestimmt wurde, mußte der Enzym-CPG-10-Komplex mit 0,5 M Tris pH 7,5 weitere 2 h bei 4°C inkubiert werden, um verbliebene freie Aldehydgruppen zu blockieren. Das immobilisierte Enzym wurde nach Waschen in 25 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 und 20 mM Mercaptoethanol suspendiert und die Aktivität der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase im Standardtest bestimmt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte jedoch nicht im Wasserbad, sondern unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Die Ausbeute an trägergebundener Enzymaktivität betrug 22%, die Kopplungsrate des Proteins 85%.

6.10 Vergleichende Stabilität von löslicher und immobilisierter SAM:(S)-Cocclaurin N-Methyltransferase

Bei der Immobilisierung der (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase betrug der Aktivitätsverlust über 75%. Eine derart niedrige Aktivitätsausbeute läßt die Verwendung von immobilisiertem Enzym im Vergleich zum löslichen kaum lohnenswert erscheinen, es sei denn, die Stabilität des an CPG-10 gebundenen Enzyms würde weit über derjenigen des löslichen Enzyms liegen. Auf diese Weise könnte der Aktivitätsverlust ausgeglichen werden.

Mit dem Ziel, die Haltbarkeit des immobilisierten Enzyms mit derjenigen des löslichen Enzyms zu vergleichen, wurden Ali-

quots der freien und der an CPG-10 gebundenen (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase bei Raumtemperatur (Zusatz von 0,05% Natriumazid), bei 4°C (Zusatz von 0,05% Natriumazid) und bei -20°C (Zusatz von 30 % Glycerin) gelagert und in regelmäßigen Abständen die Enzymaktivität bestimmt. Das freie Enzym stammte dabei aus einer Präparation, die wie unter II.5.1 beschrieben aus 25 g Gewebe von Tinospora cordifolia hergestellt worden war (22,5 pkat/mg, 11,2 mg Protein, 7ml Elutionsvolumen nach G25).

Abbildung 32 ist zu entnehmen, daß sich die Stabilität des löslichen und des immobilisierten Enzyms bei 4°C (Halbwertszeit 13 bzw. 9 Tage) und bei Raumtemperatur (Halbwertszeit 4 bzw. 5 Tage) kaum unterscheiden. Nur bei einer Temperatur von -20°C zeigten sich Unterschiede in den Halbwertszeiten. Während das freie Enzym bereits nach 25 Tagen 50 % seiner ursprünglichen Aktivität verloren hatte, erreichte das an CPG-10 gebundene Enzym diesen Wert erst nach 100 Tagen. Nach dem 100. Tag fällt die Aktivität jedoch stark ab, und das immobilisierte Enzym zeigt am 150. Tag nur noch 10 % seiner ehemaligen Aktivität. Dieser Wert wird vom freien Enzym, dessen Aktivitätsabnahme ab dem 30. Tag wesentlich langsamer verläuft, ebenfalls nach 150 Tagen Lagerung erreicht. Folglich bringt das an CPG-10 gebundene Enzym nur innerhalb der ersten 100 Tage bei einer Lagerung bei -20°C Stabilitätsvorteile.

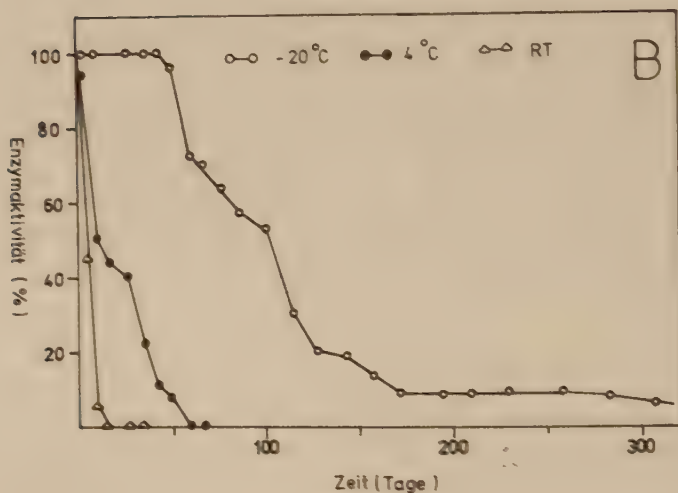
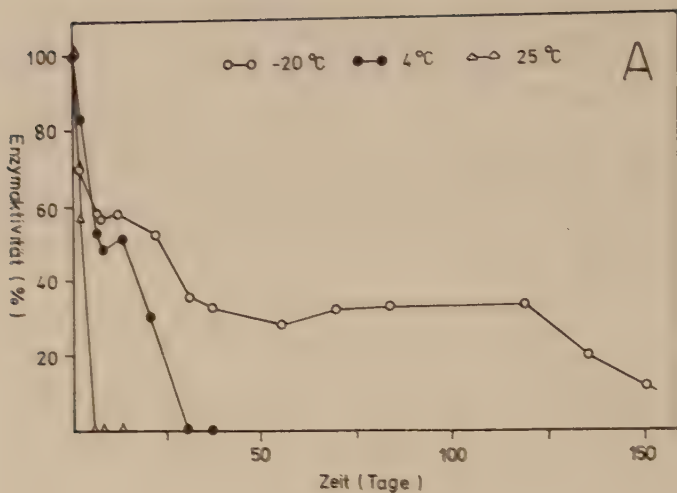


Abb. 32 Stabilität der Enzymaktivität von löslicher (A) und an CPG-10 immobilisierter (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase (B) bei verschiedenen Temperaturen. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im Standardtest.

7. Reinigung der Phenolase aus Zellsuspensionskultur von *Berberis stolonifera*

Wird der Biosyntheseweg von Norcocclaurin über Cocclaurin und N-Methylcocclaurin zum Retikulin weiterverfolgt, so muß der nächste Schritt in der Einführung einer Hydroxylgruppe in die 3'-Position von N-Methylcocclaurin bestehen. Dabei soll auch jetzt noch weiterhin offengelassen werden, ob dieser Schritt tatsächlich nach der N-Methylierung stattfindet oder ob Cocclaurin vor der N-Methylierung zuerst hydroxyliert wird (vgl. III.5).

Eine solche Hydroxylierungsreaktion könnte u.a. von mikrosomalen Hydroxylasen, α -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen, Phenolasen oder Peroxidasen katalysiert werden. Um aus dieser Vielfalt von Möglichkeiten nun speziell das Enzym für die katalytische Hydroxylierung von N-Methylcocclaurin zu finden, wurden alle aus der Literatur bekannten enzymatischen Vorgänge, bei denen eine Hydroxylgruppe in ein Substrat eingeführt wird, an Proteinrohextrakten oder Mikrosomenpräparationen aus *Berberis stolonifera*-Suspensionskultur untersucht. Die Wahl war auf dieses Gewebe gefallen, da sich (S)-Cocclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin in Fütterungsexperimenten an *Berberis stolonifera*-Suspensionskulturen als Vorstufen der Protoberberine Jatrorrhizin und Columbamin und damit auch als Vorstufen von Retikulin erwiesen hatten (STADLER et al., 1987). Folglich müßten in diesem Gewebe meßbare Mengen an hydroxylierender Enzymaktivität vorhanden sein.

Zum Test auf hydroxylierende Enzymaktivität wurden Ansätze, die in einem Gesamtvolumen von 200 μ l 0,05 μ Ci (S)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin (0,8 nmol), 50 μ mol Tricinpuffer pH 7,5 und bis zu 0,2 mg Protein enthielten, 2 h bei 30°C inkubiert. Je nach untersuchtem Enzym waren verschiedene Cosubstrate und Coenzyme zugesetzt. 50 μ l der Ansätze wurden in LM 6 chromatographiert (s. II.12; R_f-Wert N-Methylcocclaurin 0,62, 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin 0,17). Die Auswertung der Radioak-

tivitätsverteilung erfolgte am Dünnschichtscanner.

Da für das N-Methylcocclaurin hydroxylierende Enzym eine ausgeprägte Substratspezifität erwartet wurde und mikrosomale Hydroxylasen diese Eigenschaft besitzen, wurde zuerst das Vorkommen einer Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenase untersucht. Zu diesem Zweck wurde wie unter II.5.1 beschrieben eine Mikrosomenpräparation hergestellt und sowohl auf NADH-abhängige Cytochrom c-Reduktase (vgl. II.6.4) als auch auf hydroxylierende Enzymaktivität (s.o.) getestet. Als Coenzyme bzw. Cosubstrate wurden den Ansätzen folgende Substanzen einzeln oder in Kombination zugesetzt: 20 nmol NADPH, 20 nmol NADH, 20 nmol NADPH/20 nmol NADH und 20 nmol Fe^{2+} /50 nmol α -Ketoglutarat/5 μmol Ascorbat. Ebenso wurde zu einigen Testansätzen 0,1 nmol 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin als sogenannter "sparker" gegeben, da bisweilen winzige Mengen an Enzymprodukt für den Start der enzymatisch katalysierten Hydroxylierung nötig sind (vgl. BONIWELL und BUTT, 1986). In keinem der Ansätze konnte jedoch Enzymaktivität gefunden werden. Nur das Leitenzym des endoplasmatischen Retikulums, die NADH-abhängige Cytochrom c-Reduktase erwies sich als aktiv (740 pkat in einer Mikrosomenpräparation aus 50 g Gewebe). Aus diesem Grund konnte ein mikrosomales Enzym als Möglichkeit für die katalytische Hydroxylierung von N-Methylcocclaurin ausgeschlossen werden.

Der Test auf eine ebenfalls sehr substratspezifische, aber lösliche α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase verlief in gleicher Weise negativ. Er war in Anlehnung an den Assay auf die Hyoscyamin-6 β -Hydroxylase unter Zusatz von 20 nmol Fe^{2+} , 50 nmol α -Ketoglutarat und 5 μmol Ascorbat durchgeführt worden (HASHIMOTO und YAMADA, 1986).

Als weitere Möglichkeiten für lösliche Hydroxylasen kamen Enzyme mit Flavinrest, die NADPH oder NADH als Coenzym benötigen (vgl. FUJII und KANEDA, 1985), Enzyme, für die der Zusatz von O_2 und Dihydroxyfumarat essentiell ist, oder einfache Peroxidasen in Betracht (vgl. WEST, 1980). Es ließ sich jedoch auch hier keine Enzymaktivität feststellen.

Erst Tests auf eine Phenolaseaktivität, die Aromaten zu oxidieren in der Lage war, verliefen erfolgreich. Es stellte sich heraus, daß in Berberis stolonifera-Suspensionskultur eine Phenolase (Monophenol-Monooxygenase oder Monophenol,L-Dopa:Oxygen Oxidoreductase; E.C. 1.14.18.1) vorhanden war, die die Hydroxylierung von (S)-N-Methylcocclaurin an der 3'-Position katalysierte, doch nur, wenn dem Enzymanatz ausreichende Mengen Ascorbat zugesetzt waren. Der Grund dafür lag im Mechanismus der von der Phenolase katalysierten Reaktion: Phenolasen können als Cu^+ -haltige Enzyme molekularen Sauerstoff unter Ausbildung eines aktivierten Cu^+ -Enzym- O_2 -Komplexes binden. Bei der Reaktion mit einem phenolischen Substrat, in das in o-Stellung eine weitere Hydroxylgruppe eingeführt wird, geht das Enzym von der reduzierten Cu^+ -Form in die oxidierte Cu^{2+} -Form über. Um wieder die katalytisch aktive Cu^+ -Form zu erlangen, dient der Phenolase das diphenolische Produkt als reduzierendes Agens und oxidiert es zum o-Chinon. Da aber größere Mengen an oxidiertem Produkt die Phenolase hemmen, muß Ascorbat zur Reduktion des o-Chinons zugesetzt werden (ULLRICH und DUPPEL, 1975; McINTYRE und VAUGHAN, 1975). Ascorbat dient also nur indirekt als Cosubstrat, ist aber für den Ablauf der Reaktion unbedingt notwendig.

Phenolasen, die häufig auch als Tyrosinasen, Phenoloxidasen und bei der Trennung der beiden Enzymaktivitäten als Cresolasen oder Catecholassen bezeichnet werden, besitzen im Gegensatz zu mikrosomalen Hydroxylasen keine ausgeprägte Substratspezifität (vgl. WEST, 1980). Dies konnte auch für die Phenolase aus Berberis stolonifera-Suspensionskulturen bestätigt werden: In Vorversuchen wurden neben N-Methylcocclaurin auch Cocclaurin, Tyrosin und Tyramin als Substrate eingesetzt und eine Hydroxylierung bei allen vier Substanzen beobachtet. Aus dieser an sich weniger erfreulichen Eigenschaft, die im Kapitel Substratspezifität eingehend behandelt werden soll, konnte in diesem Fall ein Vorteil gezogen werden. Da nämlich kein an geeigneter Stelle radiomarkiertes

haltene Proteinniederschlag wurde in 30 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 suspendiert.

Weder im stark orange gefärbten Proteinrohextrakt, noch in der Proteinlösung nach Ammoniumsulfatfällung konnte Enzymaktivität nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist in der enzymhemmenden Wirkung der Protoberberine zu sehen, die auch für die Färbung des Rohextraktes verantwortlich waren. Um die störenden Alkaloide abzutrennen und um die Lösung zu entsalzen, wurden die 30 ml Proteinlösung auf eine G25-Säule (3 cm ϕ x 65 cm) aufgetragen, die mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 40 ml/h. Erst in diesem hellbraun gefärbten Eluat (60 ml, 308 mg Protein) ließ sich Phenolaseaktivität nachweisen (5,4 pkat/mg, 1669 pkat).

7.2 Kombinierte Chromatographie an Hydroxylapatit und DEAE-Sephacel

Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphat, das zur chromatographischen Proteinreinigung in Form von porösen, sphärischen Partikeln eingesetzt wird. Es wirkt als spezifisches Adsorbens für Proteine und weist zusätzlich Ionenaustauschereigenschaften auf. Die fraktionierte Desorption von gebundenen Proteinen gelingt durch Elution mit Phosphatpuffern steigender Ionenstärke. Dabei werden bei Enzymreinigungen hohe Aktivitätsausbeuten erzielt.

Vorversuche an Hydroxylapatitgelmaterial zeigten, daß die Phenolase nicht adsorbiert wurde und sich die Enzymaktivität im Säulendurchlauf wiederfand. Da aber 80% des Fremdproteins abgetrennt und eine 6-fache Anreicherung erzielt wurden, eignete sich diese Chromatographie als Reinigungsschritt für die Phenolase.

Neben Hydroxylapatit wurde auch DEAE-Sephacel, ein schwach basischer Anionenaustauscher, als Gelmaterial zur Reinigung der Phenolase getestet. Bei einem pH-Wert von 7,5 (10 mM Kaliumphosphatpuffer) adsorbierte das Enzym an die positiv

geladene Matrix. Eine Elution konnte erst bei einer KCl-Konzentration von 0,75 M erreicht werden. Erfolgte diese Ionenaustauschchromatographie im Anschluß an die Reinigung an Hydroxylapatit, ließ sich eine weitere 11-fache Anreicherung erzielen. Da die Phenolase - wie oben erwähnt - nicht an Hydroxylapatit adsorbierte und sich im Säulendurchlauf befand, erschien es sinnvoll, die beiden Reinigungsschritte zu kombinieren, indem die DEAE-Säule direkt hinter die Hydroxylapatitsäule geschaltet wurde. Auf diese Weise wurde die vorgereinigte Phenolase von der Hydroxylapatitsäule kontinuierlich auf die DEAE-Säule aufgepumpt, von der sie mit einer KCl-Stufe (0,75 M) eluiert werden konnte.

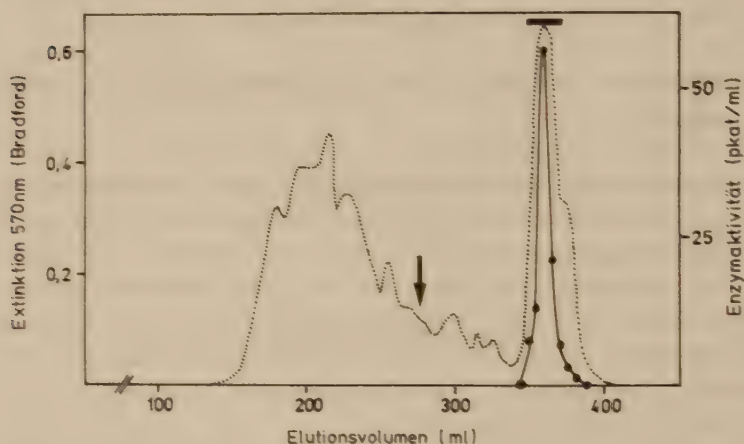


Abb. 34 Elutionsprofil der DEAE-Säule nach vorheriger Chromatographie an Hydroxylapatit. Aufgegebenes Protein: 60 ml vorgereinigter Phenolase (1669 pkat/308 mg Protein). Säulenabmessung: 2,5 ϕ cm x 29 cm. Flußrate: 25 ml/h. Elution: KCl-Stufe 0,75 M in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, zu dem die Aufgabe des Elutionsmittels erfolgte. Die Bestimmung der Phenolaseaktivität erfolgte im Standardtest. Der Balken kennzeichnet den Bereich, der vereinigt und für die weitere Reinigung verwendet wurde.

Zur Durchführung dieser kombinierten Chromatographie wurden 60 ml des G25-Säuleneluats (308 mg Protein) mit einer Flußrate von 25 ml/h auf die Hydroxylapatit-Säule (3 cm $\varnothing$ x 21 cm) aufgegeben. Sie war ebenso wie die dahinter angeschlossene DEAE-Säule (2,5 cm $\varnothing$ x 29 cm) mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert. Die Säulen wurden nach der Proteinaufgabe mit 215 ml dieses Puffers nachgewaschen und die Hydroxylapatitsäule anschließend entfernt. Die DEAE-Säule wurde mit 0,75 M KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 eluiert. Auf das Anlegen eines Gradienten wurde verzichtet, da - wie Vorversuche gezeigt hatten - keine weitere Abtrennung von Fremdprotein erzielt werden konnte. Das Eluat (26 ml, 9,4 mg Protein) wurde zum Entsalzen 2 h in 5 Liter 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert.

Abb. 34 zeigt das typische Elutionsprofil der DEAE-Säule nach dieser kombinierten Chromatographie. Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration wurde analog II.10, der Nachweis auf Phenolaseaktivität wie unter II.6.3 beschrieben durchgeführt. Der Anreicherungsfaktor betrug dabei 69.

7.3 Ionenaustauschchromatographie an Q Sepharose Fast Flow

Bei dem hier verwendeten Säulenmaterial handelt es sich im Unterschied zu DEAE-Sephacel um einen stark basischen Anionenaustauscher. Q Sepharose Fast Flow hat eine hohe Bindungskapazität und zeigt auch bei schnellen Flußraten eine gute Trennleistung. Diese Eigenschaften ließen sich bei der Reinigung der Phenolase besonders gut ausnutzen, da das Gelmaterial in eine zur FPLC-Anlage passende Säule gepackt war und mit Hilfe der FPLC-Programmiereinheit ein optimaler Gradient zur Elution geformt werden konnte.

26 ml des dialysierten DEAE-Säuleneluats (9,4 mg Protein) wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Q Sepharose Fast Flow-Säule (1,0 cm $\varnothing$ x 10 cm) aufgegeben, die zuvor mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert worden war. Zur Elution wurde ein linearer KCl-Gradient (0-400 mM KCl in

10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) über 35 ml angelegt. Danach wurde die Endkonzentration des KCl-Gradienten über weitere 5 min beibehalten und anschließend zum Waschen der Säule innerhalb von 10 min (= 10 ml Volumen) auf 2 M KCl erhöht.

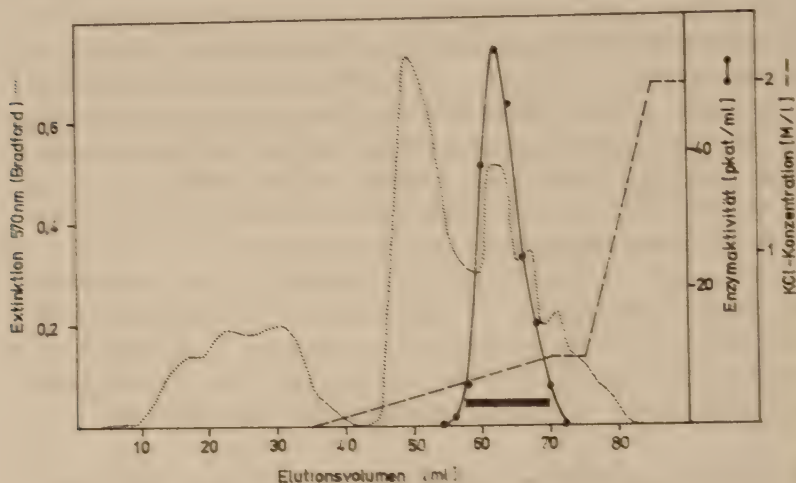


Abb. 35 Fraktionierung von vorgereinigter Phenolase (26 ml, 9,4 mg Protein) durch Ionenaustauschchromatographie an Q Sepharose Fast Flow. Säulenabmessung: 1 cm $\varnothing$ x 10 cm. Flußrate: 1 ml/min. Elution: linearer KCl-Gradient 0-400 mM in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 über 35 ml, anschließend 0,4-2 M KCl zum Waschen der Säule. Bestimmung der Phenolaseaktivität im Standardtest. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wurde vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

Wie in Abb. 35 zu sehen ist, fand sich die Phenolaseaktivität in den leicht hellbraun gefärbten Fraktionen 57 - 70 (12,5 ml, 2,1 mg Protein). Dabei konnten nochmals 75% des aufgetragenen Proteins abgetrennt und ein Anreicherungs fak-

tor von 4,7 erzielt werden. Die Fraktionen wurden vereinigt und vor dem nächsten Reinigungsschritt einer Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 unterzogen.

7.4 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Die chromatographische Trennung an Mono Q und an Q Sepharose Fast Flow beruht auf demselben Prinzip. Das Mono Q-Gelmaterial zeigt jedoch aufgrund seiner Struktur eine wesentlich höhere Trennleistung (vgl. III.5.4). Prinzipiell könnte die Reinigung an Q Sepharose Fast Flow entfallen und durch Chromatographie an Mono Q vollständig ersetzt werden. Da aber die Proteinkapazität der verwendeten Mono Q-Säule gering ist (5 mg), wurde die Ionenaustauschchromatographie an Q Sepharose als "Vorreinigungsschritt" für die Mono Q-Säule beibehalten.

12 ml des dialysierten Q Sepharose-Säuleneluats (2,1 mg Protein) wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibrierte Mono Q-Säule (0,5 cm ϕ x 5cm) aufgegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten (0-200 mM KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) über 45 ml. Zum Waschen der Säule wurde danach die KCl-Konzentration auf 1,5 M erhöht. Die Aufgabe der Proteinlösung, die Elution, das Auffangen von 1ml-Fraktionen und das Waschen der Säule erfolgte mit Hilfe der programmierbaren FPLC-Anlage.

Trotz vorheriger Reinigung an Q Sepharose Fast Flow konnten - wie Abbildung 36 zeigt - durch Chromatographie an Mono Q nochmals 70 % des aufgetragenen Proteins abgetrennt werden, was wieder die hohe Trennleistung des Mono Q-Gelmaterials beweist. Das Enzym, dessen Aktivität in den Fraktionen 49 - 56 gefunden wurde, war nach diesem vierten Reinigungsschritt 488-fach angereichert.

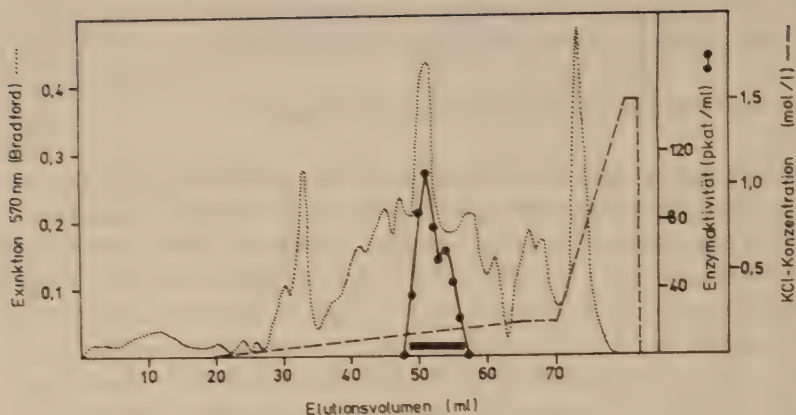


Abb. 36 Fraktionierung von vorgereinigter Phenolase (12 ml, 2,1 mg Protein) durch Ionenaustauschchromatographie an Mono Q. Säulenabmessung: 0,5 cm ϕ x 5 cm. Flußrate: 1 ml/min. Elution: linearer KCl-Gradient (0-200 mM KCl in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) über 45 ml, anschließend 0,2-1,5 M KCl zum Waschen der Säule. Bestimmung der Phenolaseaktivität im Standardtest. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wurde vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

7.5 Isoelektrische Fokussierung im granulierten Flachgel

Um die Phenolase über eine isoelektrische Fokussierung (s. II.9.1) zur Homogenität zu reinigen, wurden die Mono Q-Säuleneluate aus zwei Enzymreinigungen vereinigt (3164 pkat, 1,2 mg Protein, 14 ml) und mit Hilfe von Polyethylenglykol auf ein Volumen von 350 μ l eingengt. Zu diesem Zweck waren 50 g PEG 20000 (Serva) in 50 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 aufgeschmolzen, langsam wieder auf Raumtemperatur gebracht und in eine aus Aluminiumfolie geformte Wanne ge-

gossen worden. Die in einen Dialyseschlauch gefüllte Proteinlösung wurde in die auf 4°C gekühlte zähe Lösung gelegt, vollständig mit geschmolzenem PEG bedeckt und stündlich vorsichtig gewendet. Nach dieser Konzentrierung, die zwischen 12 und 15 h dauerte, wurden 74% der ursprünglichen Enzymaktivität und 86% des eingesetzten Proteins wiedergefunden (350 µl, 2325 pkat, 1,0 mg Protein).

Wie unter II.9.1 beschrieben wurde ein granuliertes Flachgel mit einem 2%igen Anteil von Trägerampholyten gegossen. Dabei hatte sich in Vorversuchen der pH-Bereich von 4,0 - 6,5 (Ampholine, LKB) als geeignet erwiesen. Die konzentrierte Probe (270 µl, 0,8 mg Protein, 1806 pkat) wurde in Nähe der Kathode auf das gekühlte Gel aufgetragen und über Nacht bei 400 V vorfokussiert. Anschließend wurden für drei Stunden 2000 V angelegt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein 3cm breiter Streifen einer Celluloseacetatmembran auf das Gel gerollt, nach 1 min wieder abgehoben und der Länge nach durchgeschnitten. Der eine Teil diente zur Färbung mit Ponceau S (vgl. II.9.1), der andere zum spezifischen Nachweis der Phenolase über ihre Reaktion mit dem Substrat Tyramin. Das hierbei entstehende Dopamin färbt sich nämlich in feuchtem Zustand an der Luft durch Autoxidation rasch rotbraun. Zu diesem Nachweis wurde der Streifen auf ein Filterpapier gelegt, das vorher mit einer 10 mM wässrigen Tyraminlösung befeuchtet worden war. Nach ungefähr zwei Minuten ließen sich zwei deutliche orange-braun gefärbte Banden in Nähe der Anode erkennen, die mit zwei Proteinbanden des Ponceau S-gefärbten Streifens deckungsgleich lagen. Das Gel wurde auf dieser Höhe mit einem Spatel abgehoben und in 500 µl Wasser extrahiert. Nach drei Minuten erfolgte eine pH-Wert-Bestimmung in den Gel-Wasser-Mischungen. Zur Entfernung der Trägerampholyte und des Gelmaterials wurden beide Banden getrennt einer Elektrodialyse unterworfen und auf ein Volumen von 200 µl konzentriert (s. II.9.1). Es schloß sich eine Bestimmung auf Proteingehalt und Enzymaktivität an.

Wie Abbildung 37 zeigt wurde eine ausgeprägte Phenolasebande mit einem isoelektrischen Punkt von 4,25, und eine wesentlich schwächer sichtbare Bande mit einem isoelektrischen Punkt von 3,95 gefunden. Die spezifische Enzymaktivität betrug für die Hauptbande 1089 pkat/mg (insgesamt 468 pkat,

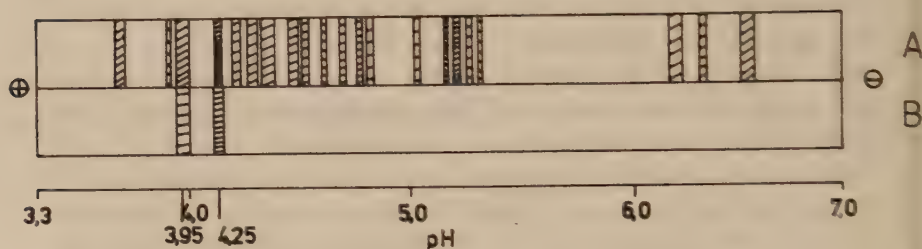


Abb. 37 Isoelektrische Fokussierung von vorgereinigter Phenolase (0,8 mg Protein, 2258 pkat) im granulierten Flachgel (1 mm dickes Gelbett, 6,2 cm x 25,9 cm). Gelmaterial: 16 ml gequollenes Sephadex G-200 Superfine, 2% Ampholine pH 4,0-6,5. Dauer: 12h/400 V, 3h/2000 V. Färbung auf Celluloseacetatmembran: **A.** mit Ponceau S auf Protein; **B.** mit wässriger Tyraminlösung auf Phenolaseaktivität. Die Schraffierungsichte soll die ungefähre Färbungsintensität wiedergeben. Bestimmung des pH-Wertes von 1 cm breiten Gelabschnitten in 500 µl Wasser. pH-Verschiebungen an Ende des Gels ergaben sich durch die verwendeten Elektrodenlösungen (s. II.2).

0,43 mg Protein) und für die Nebenbande 267 pkat/mg (69 pkat, 0,2 mg Protein). Da die beiden Phenolaseaktivitäten auch nach der isoelektrischen Fokussierung eines Enzymrohextraktes (aufgetragene Proteinmenge: 1,5 mg nach G25, s. III.7.1) nachzuweisen und folglicherweise nicht während der Reinigung aufgrund oxidativer Vorgänge entstanden waren, handelte es sich hierbei offensichtlich um multiple Enzymformen. Prinzipiell müßte nun der Vollständigkeit halber die Charakterisierung beider Enzymformen erfolgen. Da jedoch die spezifische Aktivität der gefundenen Hauptbande viermal so

hoch war wie diejenige der zweiten Bande, wurde nur die Hauptaktivität mit dem IEP von 4,25 näher untersucht und charakterisiert.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivität des eingesetzten Mono Q-Säuleneluats (2258 pkat/mg) mit derjenigen der eluierten Phenolasehauptbande (1089 pkat/mg) wird deutlich, daß mit der isoelektrischen Fokussierung zwar Fremdprotein abgetrennt, aber keine zahlenmäßige Anreicherung erzielt werden konnte. Ein Grund dafür ist sicherlich der extrem niedrige pH-Wert, dem die Phenolase über einige Zeit ausgesetzt war. So konnte in einem Versuch gezeigt werden, daß das Enzym bei pH 4,5 innerhalb von 3 h 95% seiner Aktivität verlor.

7.6 Zusammenfassende Darstellung der Reinigung und Homogenität

Mit dem beschriebenen Reinigungsverfahren bis zur isoelektrischen Fokussierung wurde eine 488-fache Anreicherung der Phenolase erreicht. Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, betrug die Aktivitätsausbeute dabei 95% und war zwischenzeitlich auf über 200% gestiegen. Dies lag höchstwahrscheinlich daran, daß in den hellbraun gefärbten Eluaten der G25-, DEAE-Sephacel- und Q Sepharose Fast Flow-Säule oxidierte phenolische Verbindungen enthalten waren, die die Phenolaseaktivität hemmen konnten. Erst das Eluat der Mono Q-Säule war farblos.

Die isoelektrische Fokussierung im Anschluß an die Ionenaustauschchromatographie an Mono Q ergab - wie bereits erwähnt - zahlenmäßig keine weitere Anreicherung. Die Anfärbung mit Ponceau S hatte aber gezeigt, daß sehr viele Fremdproteine in diesem letzten Reinigungsschritt abgetrennt worden waren (vgl. Abb. 37). Um nun die Reinheit der Phenolase eindeutig beurteilen zu können, wurden 30 µg des Enzyms nach isoelektrischer Fokussierung (Hauptbande), Vergleichsproteine mit bekanntem Molekulargewicht und 80 µg des Q Sepharose-Säuleneluats in einem 15%igem SDS-Gel elektrophoretisch aufge-

trennt (s. 11.9.2). Die Proteinfärbung des Gels zeigte deutlich, daß nach isoelektrischer Fokussierung nur noch eine Proteinbande zu erkennen war. Folglich war die Phenolase zur Homogenität gereinigt worden.

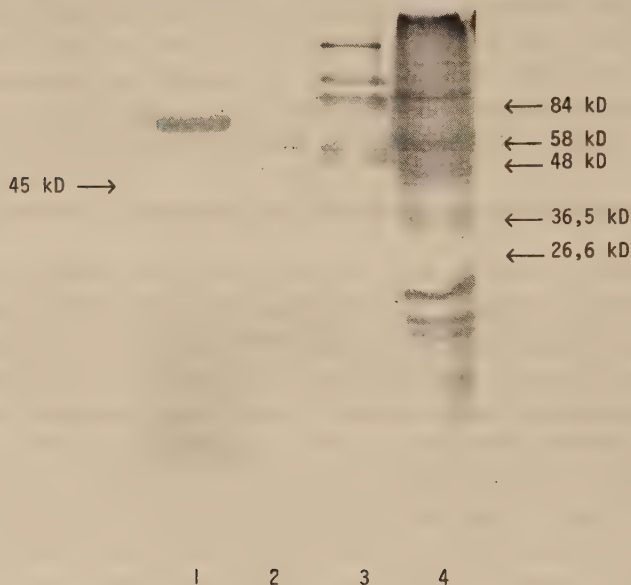


Abb. 38 Elektrophoretische Auftrennung in einem 15%igen SDS-Gel: 30 µg Ovalbumin (45 kD) (1), 30 µg Phenolase nach isoelektrischer Fokussierung (2), Eichproteine der Firma Sigma (3), 80 µg vorgereinigte Phenolase nach Ionenaustauschchromatographie an Q Sepharose Fast Flow (4). Eichproteine: Triosephosphatisomerase (26,6 kD), Lactatdehydrogenase (36,5 kD), Fumarase (48,5 kD), Pyruvatkinase (58 kD), Fructose-6-Phosphatkinase (84 kD).

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Gesamt- Protein (mg)	spez. Aktivität (pkat/mg)	Ausbeute (%)	Reinigung (x-fach)
Rohextrakt	565	0,79	712	—*	—	—
G25-Eluat	60	1,67	308	5,4	100	1
Hydroxylapatit-DEAE- Sephacel-Eluat	26	3,50	9,4	373,3	210	69
Q Sepharose Fast Flow- Eluat	12,5	3,74	2,1	1782,9	224	329
Mono Q-Eluat	7,3	1,58	0,6	2637,5	95	488
Isoelek.Fokuss.-Eluat**	0,2	0,31	0,28	1089,0	19	202

* Wegen des Gehalts an hemmenden Protuberberinen konnte keine Phenolaseaktivität nachgewiesen werden.

** Die Ergebnisse wurden für diesen Reinigungsgang zurückberechnet, da normalerweise die doppelte Menge an Mono Q-Säuleneluat für eine Fokussierung eingesetzt wurde (vgl. III.7.5).

Tab. 10 Anreicherung der Phenolase aus Zellsuspensionskultur von Berberis stolonifera

8. Charakterisierung der Phenolase

8.1 Identifizierung der Enzymprodukte

Wie in Vorversuchen bereits festgestellt wurde, führt die Phenolase nicht nur in N-Methylcocclaurin und Cocclaurin eine Hydroxylgruppe ein, sondern setzt auch andere Substrate wie Tyrosin und Tyramin um. Für den in dieser Arbeit untersuchten Biosyntheseweg sind die letztgenannten Substrate jedoch von keinem Interesse. Von den beiden Benzylisochinolininen wiederum wird N-Methylcocclaurin die größere Bedeutung beigemessen, da es nach dem hier postulierten Biosyntheseweg aus Cocclaurin durch N-Methylierung entstehen und nach Hydroxylierung und 3'-O-Methylierung in Retikulin überführt werden kann. Aus diesem Grund wurde N-Methylcocclaurin als Substrat verwendet, um die von der Phenolase katalysierte Hydroxylierung eindeutig nachzuweisen. Die bereits zweimal aufgeworfene Frage, ob nicht die Hydroxylierung vor der N-Methylierung erfolgt und damit Cocclaurin und nicht N-Methylcocclaurin das wichtigere Substrat für die Phenolase darstellt, soll in den Untersuchungen zur Substratspezifität eingehender behandelt werden.

Zur Identifizierung des aus (S)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin durch enzymatische Hydroxylierung entstandenen Produkts wurde eine aus Berberis koetianeana-Suspensionskultur 125-fach angereicherte 4'-O-Methyltransferase eingesetzt, die die Methylierung der 4'-O-Position von Benzylisochinolininen katalysiert, sofern diese in der C-3'- und in der C-4'-Position zwei freie Hydroxylgruppen besitzen (FRENZEL, 1987). Die Methyltransferase war mir freundlicherweise von Herrn Dr. T. Frenzel zur Verfügung gestellt worden.

In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 0,1 µCi (S)-N-¹⁴CH₃-Cocclaurin (1,7 nmol), 50 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 50 µmol Ascorbat und 2,6 pkat 488-fach angereicherte Phenolase (0,99 µg Protein) 2 h bei 30°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in LM 6 (s. II.12) dünnschichtchromato-

graphisch aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner ausgewertet. Das entstandene Produkt, das sich auf Höhe der Referenzsubstanz 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin befand (R_f -Wert 0,17), wurde mit Methanol eluiert, unter Stickstoff eingeeengt und in 50 μ l Wasser gelöst. Dieser Lösung wurden 25 μ mol Hepespuffer pH 8,2, 100 nm SAM und 5 pkat der oben erwähnten 4'-O-Methyltransferase zugesetzt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 30 °C erfolgte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung in LM 4 (s. II.12). Das radioaktiv markierte Produkt lag nun eindeutig auf Höhe der Referenz Retikulin (R_f -Wert 0,28). Das macht sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem Produkt aus der von der Phenolase katalysierten Hydroxylierungsreaktion um 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin gehandelt haben muß, da ohne Hydroxylgruppe an der 3'-Position keine Methylierung stattgefunden hätte.

Mit einer zweiten enzymatischen Reaktion sollte zusätzlich noch das in der eben beschriebenen Methylierungsreaktion entstandene (S)-N¹⁴CH₃-Retikulin nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde das eluierte und eingeeengte (S)-N¹⁴CH₃-Retikulin mit 25 μ mol Glycinpuffer pH 9,0 und 1 pkat aus Corydalis vaginans-Suspensionskultur 137-fach angereichertem hochspezifischen Berberinbrückenenzym bei 30°C 18 h lang inkubiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung in LM 4 zeigte, daß (S)-N¹⁴CH₃-Retikulin vollständig zu Scoulerin umgesetzt worden war (R_f -Wert Scoulerin 0,54, Retikulin 0,28). Da das Berberinbrückenenzym eine ausgeprägte Substrat- und Sterospezifität aufweist und nur die (S)-Enantiomere von Retikulin und Protosinomenin umsetzt (STEFFENS, 1984), war das gebildete radioaktiv markierte Scoulerin der Beweis dafür, daß es sich bei dem aus (S)-N¹⁴CH₃-Cocclaurin durch Hydroxylierung und Methylierung entstandenen Produktes um das (S)-Enantiomer von Retikulin gehandelt hatte.

Für die Substrate Tyrosin, Tyramin und Cocclaurin wurde der Produktnachweis über Dünnschichtchromatographie und Vergleich der R_f -Werte mit den entsprechenden Referenzsubstan-

zen geführt. Dazu wurden die Enzymsätze mit den Substraten Tyrosin und Tyramin auf Celluloseplatten in LM 7 (vgl. II.12; R_f -Wert Tyrosin 0,23, Tyramin 0,63, Dopamin 0,34, Dopa 0,18), der Ansatz mit Cocclaurin in LM 4 (vgl. II.12; R_f -Wert Cocclaurin 0,57, 3'-Hydroxycocclaurin 0,09) chromatographisch aufgetrennt. Die entstandenen Produkte konnten im Vergleich mit den R_f -Werten der Referenzsubstanzen als Dopa, Dopamin bzw. 3'-Hydroxycocclaurin identifiziert werden.

8.2 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der nativen Phenolase erfolgte über eine Gelpermeationschromatographie. Dazu wurden 1,8 ml vorgereinigtes Enzym (0,5 mg Protein, 227 pkat) mit einer Flußrate von 3 ml/min über eine kalibrierte TSK 3000 SW-Säule (2,15 cm ϕ x 60 cm) gepumpt und in 3 ml Fraktionen aufgefangen. Als Elutionsmittel diente ein 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 unter Zusatz von 25 mM Natriumchlorid. Durch Vergleich mit Eichproteinen wurde ein Molekulargewicht von 60 kD bestimmt.

Als weitere Methode zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Dies war möglich, da die elektrophoretische Auftrennung der aus dem isoelektrischen Fokussierungseluat gewonnenen Phenolase die Homogenität des Enzyms bewiesen hatte (vgl. III. 7.6). So konnte das Molekulargewicht durch Vergleich mit parallel gelaufenen Eichproteinen ermittelt werden. Es betrug unter den denaturierten Bedingungen 36 kD. Zieht man für beide Methoden einen Unsicherheitsbereich von $\pm 6\%$ in Betracht, so ist anzunehmen, daß die Phenolase im nativen Zustand aus zwei Unterheiten aufgebaut ist.

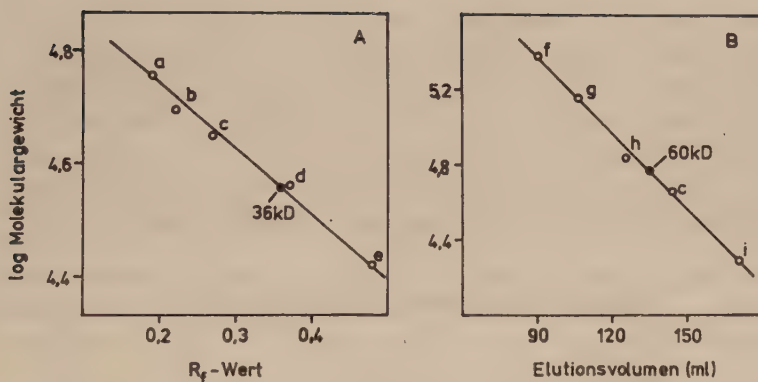


Abb. 39 Bestimmung des Molekulargewichts der Phenolase durch SDS-Gelelektrophorese (A) und Gelpermeationschromatographie (B). (A) Darstellung der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung von 30 μ g homogener Phenolase in einem 15%igem Acrylamidgel. Das zugehörige Gel ist in Abb. 38 dargestellt. Als Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht dienen: Pyruvatkinase (a, 58 kD), Fumarase (b, 48,5 kD), Ovalbumin (c, 45 kD), Lactatdehydrogenase (d, 36,5 kD), Triosephosphatisomerase (e, 26,6 kD). (B) Gelpermeations-HPLC an TSK 3000 SW-Säule (2,15 cm ϕ x 60 cm): Auftrennung von 0,5 mg vorgereinigter Phenolase (227 pkat). Als Eichproteine dienen: Katalase (f, 240 kD), Aldolase (g, 147 kD), Rinderserumalbumin (h, 67 kD), Myoglobin (i, 17,8 kD), c siehe (A).

● : Phenolase mit ermitteltem Molekulargewicht.

8.3 pH-Optimum

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Phenolaseaktivität wurden im Standardtest jeweils 4,2 pkat (1,6 μ g Protein) 488-fach angereichertes Enzym und 50 μ mol der in Abb. 40 aufgeführten Puffer eingesetzt. Der pH-Wert der Testansätze wurde vor der Inkubation mit einer Glaselektrode gemessen (s. II.3). Es ergab sich für die Phenolase ein pH-Optimum von 6,0, was einem Zusatz von 50 μ mol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 zum Reaktionsansatz entspricht. Ein derart niedriger Wert für ein pH-Optimum wurde bei den bis jetzt untersuchten

Enzymen, die die Biosynthese der Benzyloisochinoline und derer Vorläufer katalysieren, nur bei der p-Hydroxyphenylpyruvatdecarboxylase aus Berberis stolonifera-Suspensionskultur gefunden (pH-Optimum bei 6,5; RÜFFER und ZENK, 1987). Für andere Phenolasen sind jedoch aus der Literatur pH-Optima zwischen pH 5,5 und 6,5 bekannt (vgl. BAR-NUN und MAYER, 1983; STAFFORD, 1976; DUCKWORTH und COLEMAN, 1970).

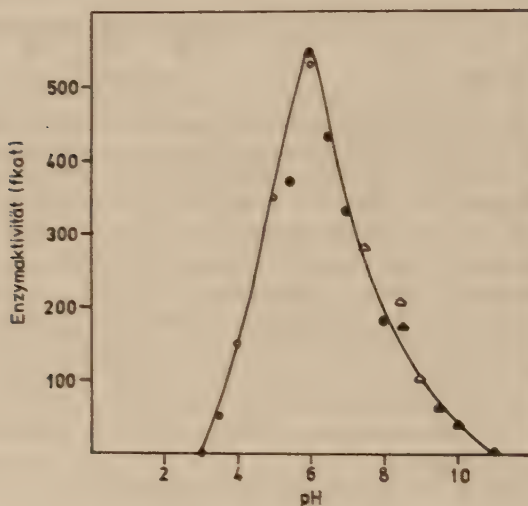


Abb. 40 pH-Abhängigkeit der Phenolase. Je 4,2 pkat (1,6 µg Protein) 488-fach angereichertes Enzym wurden unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 50 µmol folgender Puffer inkubiert:
 ○—○ Citrat/NaOH, ●—● Kaliumphosphat, △—△ Tris/HCl,
 ▲—▲ Glycin/NaOH.

8.4 Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit der Phenolaseaktivität wurde unter Standardbedingungen mit 4,2 pkat (1,6 µg Protein) 488-

fach angereichertem Enzym bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0 und 80°C bestimmt. Wie Abbildung 41 zeigt, stieg die Enzymaktivität zwischen 0 und 20°C steil an, erreichte zwischen 18 und 30°C ihr Maximum und fiel ab 37°C wieder schnell ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle enzymatischen Bestimmungen eine Inkubationstemperatur von 30°C gewählt. Im sogenannten Arrhenius-Plot ließ sich im Temperaturbereich zwischen 4 und 20°C für die von der Phenolase katalysierte Hydroxylierung von Tyrosin ein Q_{10} -Wert von 2,23 und eine Aktivierungsenergie von 53 kJ/mol ermitteln (SEGEL, 1975).

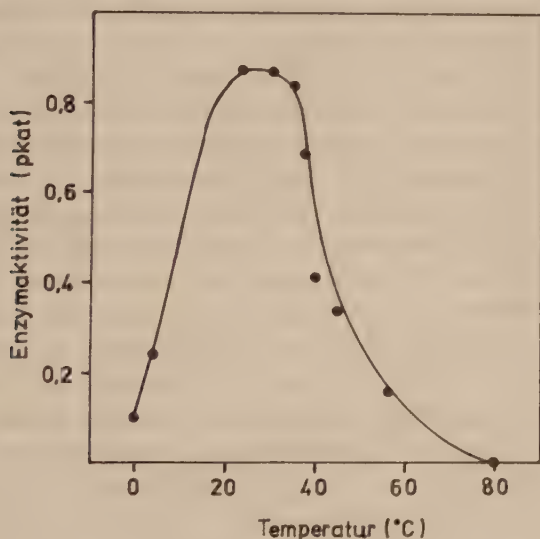


Abb. 41 Temperaturabhängigkeit der Phenolase. Je 4,2 pkat (1,6 µg Protein) 488-fach angereichertes Enzym wurden unter Standardbedingungen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

8.5 Substratspezifität

Im Laufe dieser Arbeit tauchte bereits mehrmals die Frage auf, ob Coclaurin - wie bisher beschrieben - vor der Einfüh-

rung einer Hydroxylgruppe in 3'-Position erst N-methyliert wird oder ob die Hydroxylierung nicht vor der N-Methylierung erfolgt. Diese Frage nach der Reihenfolge der enzymatischen Umsetzung könnte möglicherweise durch Untersuchungen zur Substratspezifität der Phenolase geklärt werden.

Während die Bestimmung der Phenolaseaktivität gegenüber 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyrosin und 3,5- $^3\text{H}_2$ -Tyramin über den Tritiumausbaute test einfach zu bewerkstelligen war, mußten für (R)- und (S)-6- $^{14}\text{CH}_3$ -Coclaurin und (R,S)-N- $^{14}\text{CH}_3$ -Methylcoclaurin die Umsatzraten mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt werden, da keine entsprechenden an der 3'-Position tritiummarkierten Substanzen zur Verfügung standen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 1/5 der Ansätze in LM 4 aufgetrennt (s. II.12; R_f -Werte Coclaurin 0,57, 3'-Hydroxycoclaurin 0,09, N-Methylcoclaurin 0,62, 3'-Hydroxy-N-Methylcoclaurin 0,17) und die Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner bestimmt. Das vom Scanner auf Papier aufgezeichnete Profil der Radioaktivitätsverteilung wurde durch Wägung quantifiziert und zur Berechnung der Umsatzrate und der Phenolaseaktivität die Peakfläche des Produktes auf die Gesamtfläche bezogen. Um den Unsicherheitsbereich dieser Methode zu bestimmen, wurde die Zeitabhängigkeit der Phenolasereaktion mit dem Substrat Tyramin sowohl über den Tritiumausbaute test als auch mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt (Celluloseplatten, LM 7; R_f -Wert Tyramin 0,63, Dopamin 0,34). Dabei wich das Ergebnis der oben beschriebenen Methode nur um 7% von dem des Tritiumausbaute tests ab.

Um die Phenolaseaktivität gegenüber den 5 zur Verfügung stehenden Substraten (Tyrosin, Tyramin, (R,S)-N-Methylcoclaurin, (S)-Coclaurin, (R)-Coclaurin) zu testen, wurden in einem Gesamtvolumen 150 μl von jeweils 50 μmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 30 μmol Ascorbat, 0,76 μkat (bezogen auf Tyrosin) homogenes Enzym (0,83 μg Protein) und 0,05 μCi Substrat (10 nmol) 1/2 h lang bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit war für alle Substrate ein Umsatz im linearen Bereich der Reaktionskinetik gewährleistet. Die dünnschicht-

chromatographische Auftrennung und Bestimmung der Umsatzraten erfolgte wie oben beschrieben mit Hilfe der Wägetechnik. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Wie bereits die Vorversuche gezeigt hatten, setzte die Phenolase alle fünf Substrate zu ähnlichem Ausmaß um und differenzierte nicht zwischen den Benzylisochinolin und deren biosynthetischen Vorstufen Tyrosin und Tyramin. Auch machte das Enzym keinen Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren von Coclaurin. Genausowenig ließen die recht nahe beieinanderliegenden Phenolaseaktivitäten gegenüber den Substraten N-Methylcoclaurin und Coclaurin eine Aussage über die Reihenfolge der N-Methylierung und Hydroxylierung zu.

Substrat	Umsatzrate (%)	K _M -Wert (mmol/l)
Tyramin	100	0,29
(R,S)-N-Methylcoclaurin	80	0,58
(R)-Coclaurin	71	0,63
L-Tyrosin	67	0,83
(S)-Coclaurin	60	0,75

Tab. 11 Übersicht über die Substanzen, die als Substrate der Phenolase getestet wurden. Die Ansätze enthielten 10 nmol Substrat, 50 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 30 µmol Ascorbat und 0,76 pkat homogenes Enzym. Die Messung der Umsatzraten erfolgten für Tyrosin und Tyramin im Tritiumausbautest, für N-Methylcoclaurin und die beiden Enantiomere von Coclaurin über die Quantifizierung der Radioaktivitätsverteilung nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung. Die Umsatzraten sind auf Tyramin bezogen.

Um weitere detailliertere Auskünfte über die Affinität der Phenolase zu den Substraten zu erhalten, wurden die K_M-Werte der fünf Substanzen bestimmt. Dazu wurden für Tyrosin und

Tyramin Standardansätze mit jeweils 2,3 pkat homogener Phenolase (2,1 μg Protein) 1/2 h bei 30°C inkubiert und die aus dem Tritiumausbauteil erhaltenen Meßergebnisse in der linearisierten, doppeltreziproken Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) graphisch ausgewertet. Dabei ergab sich für Tyramin ein K_M -Wert von 0,29 mmol/l und ein $V_{\max}$ von 30 pmol/s. Für Tyrosin betrug der K_M -Wert 0,83 mmol/l und $V_{\max}$ 36 pmol/s.

Für die K_M -Wert-Bestimmung von N-Methylcocclaurin und (R)- und (S)-Cocclaurin wurde Ansätze mit 0,84 μg homogener Phenolase (0,91 pkat bezogen auf Tyrosin), 50 μmol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 50 μmol Ascorbat und varrierten Substratmengen 1/2 h bei 30°C inkubiert. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung in LM 4 erfolgte die Ermittlung der Umsatzraten nach der oben beschriebenen Technik und anschließend die graphische Auswertung im Lineweaver-Burk-Diagramm. Die K_M -Werte betrugen für (R,S)-N-Methylcocclaurin 0,58 mmol/l ($V_{\max}$ 16 pmol/s), für (S)-Cocclaurin 0,75 mmol/l ($V_{\max}$ 21 pmol/s) und für (R)-Cocclaurin 0,63 mmol/l ($V_{\max}$ 20 pmol/s).

Da sich die ermittelten K_M -Werte kaum unterschieden, konnten damit keine genaueren Aussagen über das physiologische Substrat für die Phenolase gemacht werden. Zwar ist der K_M -Wert von N-Methylcocclaurin etwas kleiner als derjenige von (S)-Cocclaurin, doch ist die Differenz zu gering, um daraus Schlüsse über die Abfolge der N-Methylierung und der Hydroxylierung zu ziehen. Ferner muß aufgrund der fehlenden Substratspezifität davon ausgegangen werden, daß auch andere Substanzen von der Phenolase in vitro zu den entsprechenden hydroxylierten Derivaten umgesetzt werden, so z.B. Norcocclaurin zu 3'-Hydroxy-Norcocclaurin (Norlaudanolin).

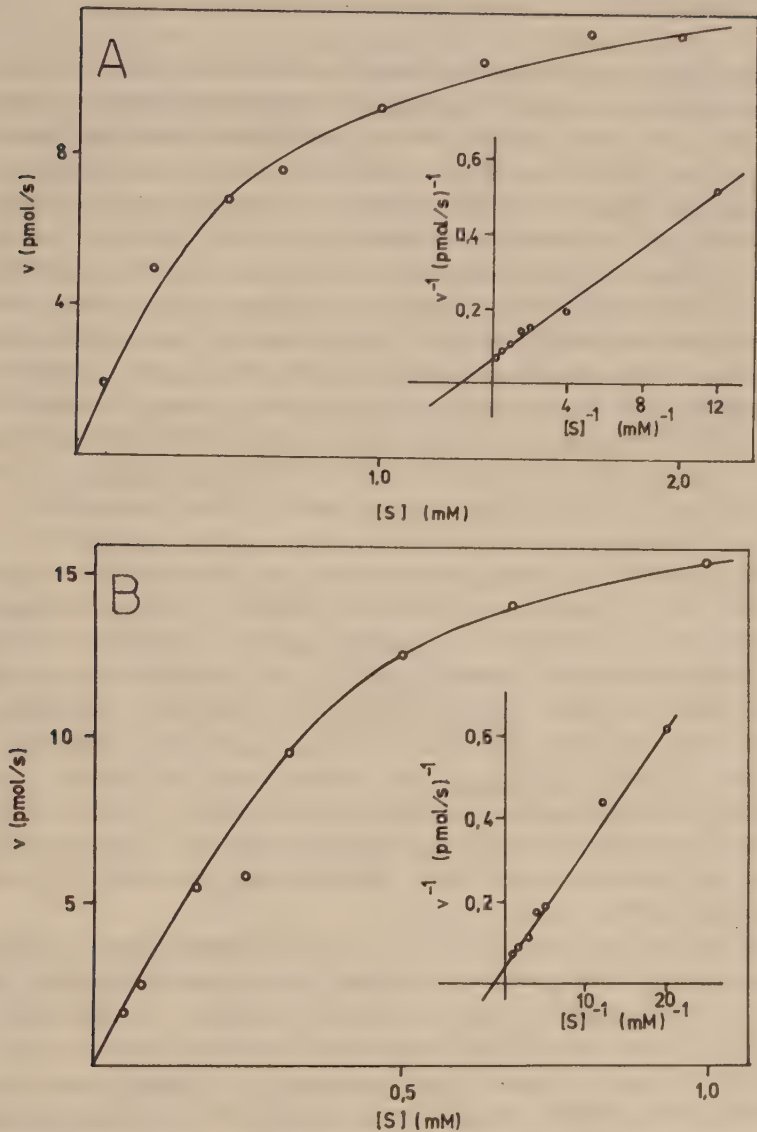


Abb. 42 Bestimmung des K_M -Wertes der Phenolase für (R,S)-N-Methylcoclaurin (A) und (S)-Coclaurin (B). Bedingungen: 0,9l pkat homogene Phenolase, 50 μ mol Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 30 μ mol Ascorbat, 30°C, 30 min. Ermittelte K_M -Werte: (R,S)-N-Methylcoclaurin 0,58 mM (A), (S)-Coclaurin 0,75 mM (B).

8.6 Hemmstoffe

Die Kenntnis von der Hemmwirkung verschiedener niedermolekularer Substanzen auf ein Enzym ermöglicht häufig, Rückschlüsse auf den enzymatisch katalysierten Reaktionsmechanismus und bestimmte Strukturmerkmale des Enzym zu ziehen. Besonders deutlich wird dies bei enzymatisch katalysierten Umsetzungen, an denen Metallionen beteiligt sind. Denn meistens läßt sich das Enzym durch Komplexbildung der Metallionen in seiner Aktivität stark beeinflussen. Da auch für die Phenolase das Vorhandensein eines Kupferions angenommen wurde, sollte die Wirkung von Chelatbildnern auf die Phenolaseaktivität untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 1,5 μ kat 488-fach angereichertes Enzym (0,6 μ g Protein) mit den zu untersuchenden Substanzen unter Standardbedingungen 1/2 h inkubiert. Als Vergleich dienten Ansätze ohne Hemmstoffe.

Aus der Literatur war bekannt, daß vor allem der Cu^{2+} -Komplexbildner Diethyldithiocarbamat die Phenolaseaktivität beeinflußt. So wurde eine 100%ige Hemmung der Tyrosinaseaktivität aus dem Latex von Papaver somniferum bei einer 1 mM DIECA-Konzentration (ROBERTS, 1971) und eine 50%ige Hemmung der Phenolase aus Papaver somniferum bei 0,12 mM DIECA beobachtet (ASGHAR und SIDDIQI, 1970). Auch bei der Phenolase aus Berberis stolonifera-Suspensionskultur erwies sich Diethyldithiocarbamat als stärkster getesteter Inhibitor: Eine 5 μ molare Konzentration bewirkte bereits eine Halbierung der Phenolaseaktivität, 100% Hemmung wurde bei 0,3 mM DIECA gefunden.

Auch für die Cu^{+} -Komplexbildner KCN und Bathocuproin (Sigma) konnte eine inhibierende Wirkung festgestellt werden. 70 μ mol/l Kaliumcyanid führten zu einer 50%igen, 0,5 mM Bathocuproin zu einer 18%igen Hemmung der Phenolaseaktivität. Höhere Konzentrationen von Bathocuproin ließen sich aus Löslichkeitsgründen nicht untersuchen. Diese Ergebnisse zeigten wie bei anderen Phenolasen auch, daß in einer Enzympräparation sowohl die katalytisch aktive Cu^{+} -, wie auch die

oxidativ inaktivierte Cu^{2+} -Form enthalten war (vgl. McINTYRE und VAUGHAN, 1974; DUCKWORTH und COLEMAN, 1970). Für andere Me^+ -Chelatbildner, wie Bathophenanthrolindisulfonat und Bathocuproindisulfonat (beide Sigma) konnte aber keine Hemmwirkung beobachtet werden.

Als weitere Metallionenkomplexbildner wurden Natriumazid, Dipicolinsäure, Na_2EDTA und Thioharnstoff getestet. Während Na_2EDTA in 10 mM Konzentration keine inhibierende Wirkung zeigte, ließ sich in derselben Konzentration für Dipicolinsäure eine 22%ige Hemmung erreichen. Eine Halbierung der Phenolaseaktivität bewirkten 12 mmol/l Natriumazid und 13 mmol/l Thioharnstoff. In Tabelle 12 sind sämtliche Substanzen, die auf Hemmwirkung gegenüber der Phenolaseaktivität getestet wurden, noch einmal zusammengefaßt.

Verbindung	Konzentration (mmol/l)	Hemmung (%)
Diethyldithiocarbamat	0,005 0,3	50 100
Kaliumcyanid	0,07 1,0	50 100
Bathocuproin	0,5	18
Natriumazid	12	50
Thioharnstoff	13	50
Dipicolinsäure	10	22
Bathocuproindisulfonat	10	0
Bathophenathrolin- disulfonat	10	0
Na ₂ EDTA	10	0

Tab. 12 Übersicht über die Substanzen, die auf Hemmwirkung gegenüber der Phenolase untersucht wurden. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte unter Standardbedingungen mit 1,5 pkat 488-fach angereicherter Phenolase und Tyrosin als Substrat.

9. Aufbau eines Radioimmuntests für (S)- und (R)-Cocclaurin

In Fütterungsexperimenten an Keimlingen von Papaver somniferum war nachgewiesen worden, daß (S)-Cocclaurin eine biosynthetische Vorstufe der Opiumalkaloide und damit auch eine Vorstufe von (S)-Retikulin darstellt. In dieses kann Cocclaurin - wie bereits beschrieben - durch N-Methylierung, Hydroxylierung und eine 3'-O-Methylierung überführt werden. Cocclaurin kann somit wie Retikulin als zentrales Zwischenprodukt der Morphinbiosynthese angesehen werden.

Um diesem aufgrund von Applikationsexperimenten und enzymatischen Untersuchungen gezogen Schluß mehr an Beweiskraft zu verleihen, war es nötig, Cocclaurin als tatsächlich vorkommendes Intermediat in den Keimlingen von Papaver somniferum nachzuweisen. Als Methode, den vermuteten äußerst geringen "Pool" an Cocclaurin in pflanzlichem Gewebe zu bestimmen, wurde eines der empfindlichsten und hochspezifischsten Nachweisverfahren, der Radioimmuntest gewählt.

Der Radiomimmuntest beruht auf folgendem Prinzip: Eine definierte Menge an radioaktiv markiertem Antigen und eine variable Menge an unmarkiertem Antigen konkurrieren um eine im Unterschuß vorliegende Zahl an Bindungsstellen eines für das Antigen spezifischen Antikörpers. Dabei wird die Antikörperkonzentration so gewählt, daß maximal 30 - 50% des markierten Antigens in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden werden. Je weniger unmarkiertes Antigen vorhanden ist, um so mehr können radiomarkierte Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden. Diese Komplexe sind also ein direktes Maß für die Konzentration der zu messenden Menge an unmarkiertem Antigen. Nach Abtrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe kann die Radioaktivität der freien oder der gebundenen Phase gemessen und über Eichkurven die Konzentration der zu bestimmenden Substanz ermittelt werden. Der RIA verbindet damit die hohe Empfindlichkeit der Radioaktivitätsmessung mit der hohen Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion. Für phytochemische und pflanzenphysiologische Untersuchungen

war der RIA seit 1976 eingesetzt worden (WEILER und ZENK, 1976). Von den seither entwickelten Radioimmuntests waren für diese Arbeit besonders die Tests für die Opiumalkaloide Thebain, Codein und Morphin (SUND, 1978; WIECZOREK, 1985) und für die beiden Enantiomere von Retikulin (WIECZOREK, et al., 1986) von Bedeutung. So konnten die Applikationsexperimente an Keimlingen und 5-Wochen-alten Pflanzen von Papaver somniferum erst durchgeführt werden, nachdem über radioimmunologische Bestimmung ein für Fütterungsexperimente ausreichender Gehalt an Thebain bzw. Morphin in den Keimlingen bzw. Pflanzen festgestellt worden war (s. III.1.1 und III.1.2). Um nun in den Keimlingen auch das vermutete Vorkommen und den Gehalt an (R)- und (S)-Cocclaurin nachzuweisen, sollte ein Radioimmuntest für die beiden Enantiomere von Cocclaurin aufgebaut werden. Mit Hilfe eines solchen Testsystems könnten auch Vertreter anderer benzylisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien auf das Vorkommen von Cocclaurin untersucht werden.

9.1 Darstellung von (S)- und (R)-Cocclaurin-Konjugaten zur Erzeugung spezifischer Antikörper

Einer der ersten Schritte beim Aufbau eines Radioimmuntests besteht in der Erzeugung von spezifischen Antikörpern gegen die zu messende Substanz. Dabei muß berücksichtigt werden, daß Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 Dalton nicht immunogen sind. Um dennoch in einem Organismus die Bildung gegen sie gerichteter spezifischer Antikörper zu induzieren, müssen diese niedermolekularen Substanzen, die auch Haptene genannt werden, zuvor kovalent an ein immunogenes Makromolekül gebunden werden. Voraussetzung für eine solche Kopplung ist das Vorhandensein von geeigneten funktionellen Gruppen im Hapten. So erfolgt z.B. die Verknüpfung von Rinderserumalbumin mit einer niedermolekularen Substanz über die Ausbildung von Peptidbindungen zwischen den ϵ -Aminogruppen von Lysinresten von BSA und Carboxylgrup-

pen des Haptens (CHARD, 1978).

Da die meisten Haptene keine geeigneten funktionellen Gruppen für eine direkte Kopplung an ein Carrier-Protein besitzen, müssen sie entsprechend derivatisiert werden. Im Falle des Cocclaurins wurde von den beiden Enantiomeren der Cocclaurin-N-Propionsäure ausgegangen. Es war anzunehmen, daß das Protein an die am Stickstoff befindliche Carboxylgruppe binden würde. Auf diese Weise würde weder die Stereokonfiguration des Cocclaurins am C-1-Atom, noch das Substitutionsmuster der beiden aromatischen Ringe beeinflußt werden. Die gegen (S)- bzw. (R)-Cocclaurin gerichteten Antikörper sollten folglich spezifisch die beiden Enantiomere erkennen und anders substituierte Benzylisochinolone nicht binden können. Die einzige zu erwartende Kreuzreaktion war diejenige mit N-Methylcocclaurin, da der Antikörper diesen Teil des Moleküls, über den es an das Carrierprotein gebunden ist, nicht spezifisch erkennen kann.

Zur Kopplung von Rinderserumalbumin mit Haptenen, die eine Carboxylgruppe besitzen, eignet sich vor allem die Carbodiimid-Methode. Bei dieser Reaktion geht das Carbodiimidderivat, z.B. das wasserlösliche EDC mit der Carboxylgruppe des Haptens eine O-Acylharnstoffverbindung ein. Diese aktivierte Zwischenstufe kann dann eine Peptidbindung mit den Aminogruppen des Rinderserumalbumins bilden. Die Kopplung wird dabei meist in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei unterliegt ein großer Teil der aktivierten Säuren der Hydrolyse und schränkt so die Ausbeuten erheblich ein. Verhindert werden kann dies, indem zum Reaktionsansatz N-Hydroxysulfo-succinimid zugegeben wird. Diese Substanz reagiert mit den aktivierten Säuren zu wasserlöslichen Succinimidyestern, die im Vergleich zu den O-Acylharnstoffverbindungen nur sehr langsam hydrolysieren (STAROS et al., 1986; ANDERSON et al., 1964).

Diese Reaktion wurde mit den N-Propionsäurederivaten des Cocclaurins folgendermaßen durchgeführt (nach ARENS, 1979):

Lösung A: 23,6 mg (60 μ mol) (S)- oder (R)-Cocclaurin-N-Propionsäure in 2,5 ml Pyridin/Wasser (1/1)
Lösung B: 61 mg (304 μ mol) EDC und 17 mg (78 μ mol) Natrium-N-Hydroxysulfosuccinimid (s. II.4.1) in 3,5 ml Pyridin/Wasser (1/1)

Lösung C: 100 mg (1,7 μ mol) BSA in 5,5 ml Wasser

Unter konstantem Rühren wurde die Lösung B bei Raumtemperatur innerhalb von 5 min tropfenweise zu Lösung A gegeben. Nach weiteren 10 min wurde die Lösung C in einem Zeitraum von 5 min zu Lösung A zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 4 Tage lang bei 4°C gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Während der Dialyse fiel ein gelblich-weißer Niederschlag aus. Das Konjugat (Lösung und Niederschlag) wurde gefriergetrocknet und für die Immunisierungen in einer Konzentration von 2 mg/ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (s. II.7.1). Die Ausbeute betrug für das (S)-Cocclaurin-N-Propionsäure-BSA-Konjugat 77 mg und für die entsprechende (R)-Cocclaurin-Verbindung 81 mg.

Um zu überprüfen, ob die Kopplung erfolgreich verlaufen war, wurde ein Aliquot der Konjugatlösung mit bekanntem Proteingehalt auf eine Kieselgelplatte aufgetüpfelt und mit folgenden Sprühreagenzien behandelt: Jodplatinat, Dragendorff und diazotierte Sulfanilsäure. Im Vergleich mit gleichen Mengen BSA konnte bei den Konjugaten nach Behandlung mit den beiden letzten Sprühreagenzien eine eindeutige Orange-Färbung beobachtet werden. Dies zeigte - wenn auch nur qualitativ -, daß die Kopplung erfolgreich verlaufen war.

Von den vier mit unterschiedlichen Mengen an (S)-Cocclaurin-N-Propionsäure-BSA-Konjugat immunisierten Kaninchen (s. II.7.1) ergab nur das Tier, das mit 50 μ g Konjugat vorimmunisiert worden war, Seren mit einer Bindung über 30%. Für die Entwicklung des (S)-Cocclaurin-Radioimmuntests wurden die Serumfraktionen, die aus den ersten vier Blutentnahmen erhalten worden waren, vereinigt. Von den drei mit dem (R)-Cocclaurin-N-Propionsäure-BSA-Konjugat immunisierten Kanin-

chen bildete ebenfalls nur ein Tier ein Antiserum. Dessen Bindung lag jedoch mit 12% wesentlich niedriger. Das für die radioimmunologischen Bestimmungen von (R)-Cocclaurin benutzte Serum bestand aus den Blutabnahmen 4 und 5.

9.2 Optimierung der Testbedingungen

Neben den bindungsfähigen Antiseren sind radioaktiv markierte Antigene die wichtigsten Bestandteile von radioimmunologischen Testsystemen. Die für den Cocclaurin-RIA eingesetzten radiomarkierten Antigene (R)- und (S)-6-OC³H₃-Cocclaurin waren wie unter II.4.3 beschrieben dargestellt worden. Ihre hohe spezifische Aktivität von 12 Ci/mmol gewährleistete eine hohe Empfindlichkeit der Testsysteme, da zur Verdrängung einer äquivalenten Menge radiomarkierten Antigens nur sehr geringe Mengen an unmarkiertem Antigen benötigt wurden und damit bereits Spuren der zu messenden Substanz nachgewiesen werden konnten.

Mit den erzeugten Antiseren und Tritium-markierten Cocclaurin-Antigenen waren nun zwar die Voraussetzungen für den Aufbau der Radioimmuntests geschaffen, doch mußten zuerst noch einige Testparameter wie der pH-Wert der Inkubationslösung und die Methode zur Trennung des gebundenen von freiem Antigen festgelegt werden. Dies war nötig, da Radioimmuntests für verschiedene Substrate bei unterschiedlichen Bedingungen optimal arbeiten und folglich diese Bedingungen für jedes Testsystem individuell optimiert werden müssen.

Wie bereits erwähnt, sollte die Antikörperkonzentration so eingestellt werden, daß in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen 30 - 50% des markierten Antigens gebunden werden. Diese Bedingung konnte für das (S)-Cocclaurin-Antiserum erfüllt werden, während das (R)-Cocclaurin-Antiserum in einer 1:5-Verdünnung nur 22% Bindung zeigte. Da das Antiserum wegen ansteigender unspezifischer Bindung nicht noch konzentrierter eingesetzt werden konnte, wurden die folgenden (R)-Cocclaurin-Radioimmuntests mit der 1:5-Verdünnung durchge-

führt.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion für den (S)- und (R)-Cocclaurin-RIA. Wie Abbildung 43 zu entnehmen ist, zeigte das (S)-Cocclaurin-Antiserum im alkalischen Bereich ab pH 8,2 die höchsten Bindungswerte bei über den ganzen pH-Bereich gleichbleibend niedriger unspezifischer Bindung. Da sich jedoch das radiomarkierte Antigen im alkalischen Milieu als nicht stabil erwies, wurde als Puffer für alle weiteren Tests 0,07 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,5 eingesetzt. Dieses Puffersystem war phosphatgepuffertes physiologischer Kochsalzlösung, die bei Radioimmuntests die weiteste Verwendung findet, vorgezogen worden, da hier eine höhere Bindungsrate beobachtet worden war. Im (R)-Cocclaurin-RIA zeigte sich eine optimale Antigen-Antikörper-Reaktion im pH-Bereich zwischen 6,6 und 7,9. Die unspezifische Bindung erwies sich dagegen wie beim Test auf das (S)-Enantiomer als pH-unabhängig. Als geeignetstes Puffersystem wurde wiederum 0,07 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,5 gewählt.

Eine Trennung von gebundenem und freien Antigen ist u.a. durch Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Ammoniumsulfat möglich. Da sich diese Methode in der Vergangenheit bewährt hatte (CHARD, 1971; WEILER, 1977), sollte sie auch für den Cocclaurin-RIA verwendet werden. Zur Ermittlung des geeigneten Fällungsbereiches wurde zu den Testansätzen jeweils 1 ml Ammoniumsulfatlösung steigender Konzentration zugegeben und wie unter II.7.2 beschrieben weiter verarbeitet. Abbildung 44 zeigt, daß sowohl beim (S)- wie auch beim (R)-Cocclaurin-RIA bei einer 52%igen Ammoniumsulfat-Sättigung der Ansätze die Differenz zwischen der spezifischen und der unspezifischen Bindung am größten war. Um diese Konzentration zu erreichen, mußten zur Fällung 1 ml einer 100% gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugesetzt werden.

Neben der Optimierung des pH-Wertes der Inkubationslösung und der Methode zur Trennung der gebundenen von den freien

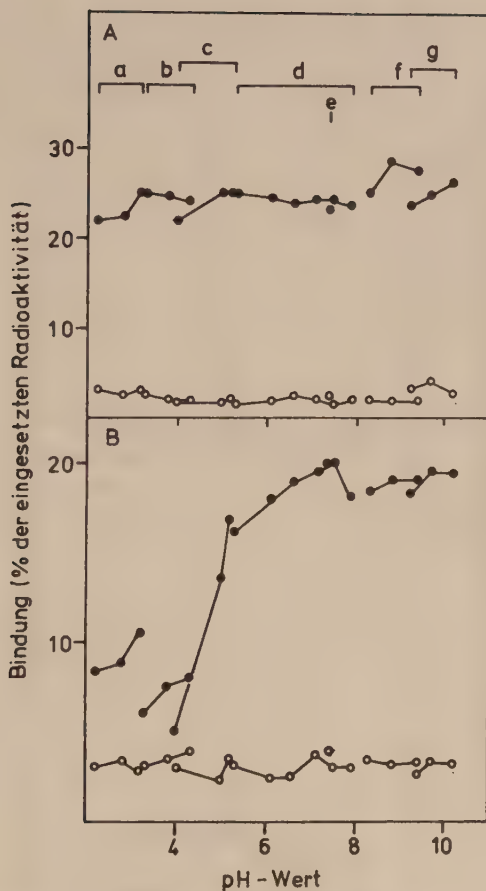


Abb. 43 Bindung des markierten Antigens an den Antikörper in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationslösung. **A.** im (S)-Coclaurin-RIA, **B.** im (R)-Coclaurin-RIA.

a: 0,1 M Glycin/HCl, b: 0,1 M Natriumcitrat/HCl, c: 0,1 M Natriumacetat/NaOH, d: 0,07 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, e: phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, f: 0,1 M Tris/HCl, g: 0,1 M Glycin/NaOH.

- spezifische Bindung in Anwesenheit von Antikörpern
- unspezifische Bindung in Abwesenheit von Antikörpern

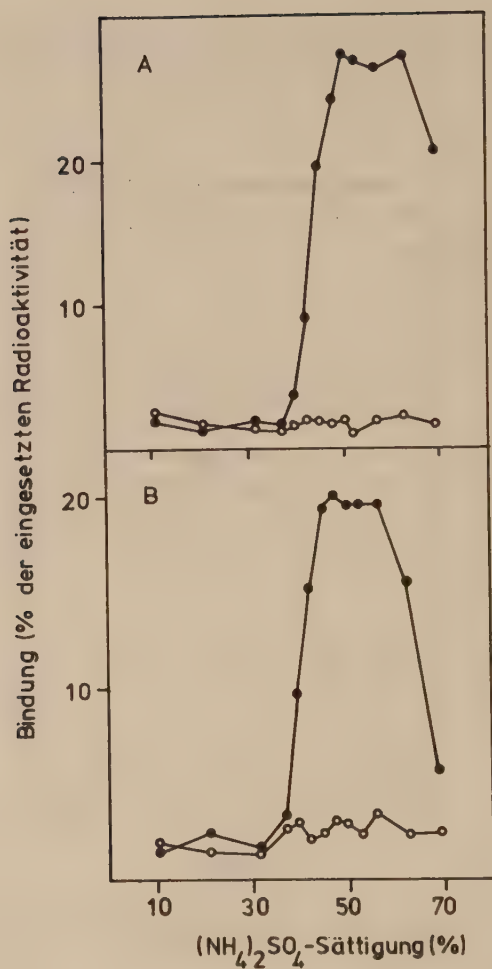


Abb. 44 Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes (●) und unspezifische Fällung des markierten Antigens (○) in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatsättigung im A. (S)-Cocclaurin-RIA und B. im (R)-Cocclaurin-RIA.

Antigenmolekülen ist es erforderlich, für jedes Antiserum die für den Test geeignete Verdünnung, den Titer festzulegen. Diese Bestimmung erfolgt, indem steigende Verdünnungen des Antiserums mit einer konstanten Menge des markierten Antigens in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen inkubiert werden. Für jeden Ansatz wird die prozentuale Bindung bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität berechnet ($= B_0$). Werden diese ermittelten B_0 -Werte gegen die Serumverdünnung aufgetragen, ergibt sich die Titerkurve, aus der die für den Test notwendige Serumverdünnung abgelesen werden kann. Dabei wird der Titer so gewählt, daß in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen ungefähr 30% des markierten Antigens gebunden werden. Dies hat zur Folge, daß der Test sehr empfindlich wird, da bereits die Zugabe einer geringen Menge unmarkierten Antigens eine Verdrängung des markierten Antigens aus den Antigen-Antikörper-Komplexen bewirkt. Die für die Antiseren gegen (S)- und (R)-Cocclaurin ermittelten Titerkurven sind in Abbildung 45 dargestellt. Für das Serum gegen (S)-Cocclaurin wurde die 1:20-Verdünnung für alle weiteren Tests festgelegt. Dies entsprach einer Bindung von 26% und einer Endverdünnung im Test von 1:180. Bei dem (R)-Cocclaurin-Serum konnte bei einem Titer von 1:5 eine maximale Bindung von 23% erreicht werden. Eine weitere Verdünnung war nicht möglich, da die Empfindlichkeit eines Tests bei einem unter 20% liegenden B_0 -Wert stark sinkt (CHARD, 1978). Obwohl mit einer hohen unspezifischen Bindung zu rechnen war, mußte deswegen für den (R)-Cocclaurin-RIA diese 1:5-Verdünnung verwendet werden. Die entsprechende Endverdünnung des (R)-Cocclaurin-Serums betrug demnach im Testansatz 1:45. Alle weiteren Testbedingungen wurden von den Testsystemen für (S)- und (R)-Retikulin übernommen (WIECZOREK, 1985) und unter II.7.2 beschrieben.

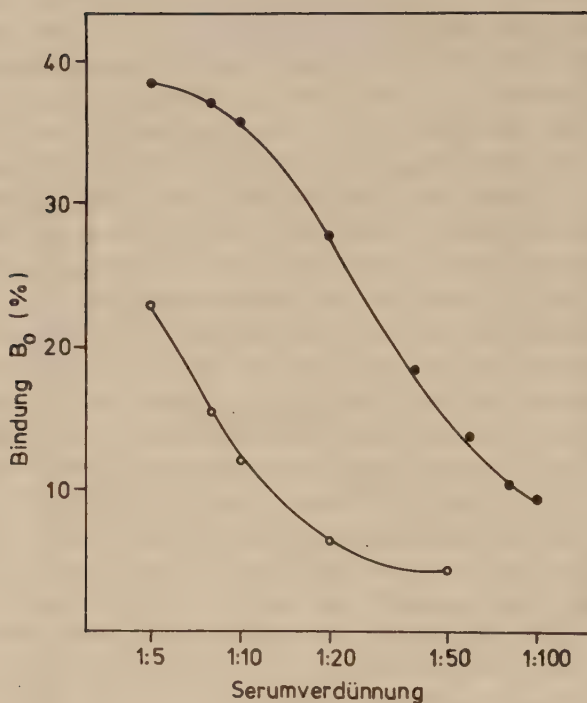


Abb. 45 Titerkurven der Antiseren gegen (S)-Cocclaurin (●) und (R)-Cocclaurin (○).

9.3 Standardisierung der Tests

Die Quantifizierung von Cocclaurin in unbekannten Proben erfolgte durch Vergleich mit einer Standardkurve, die für jede Testreihe neu erstellt werden mußte. Dazu wurden den Inkubationsansätzen, die konstante Mengen an markiertem Antigen und Antiserum enthielten, steigende bekannte Mengen an unmarkiertem Antigen zugesetzt. Die Verdrängung des ra-

radioaktiv markierten Antigens aus den markierten Antigen-Antikörper-Komplexen ließ sich durch Messung der Radioaktivitätsabnahme verfolgen. Zur graphischen Darstellung der Standardkurve wurden aus den Meßergebnissen die relative prozentuale Bindung B/B_0 errechnet (bezogen auf die erreichte Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen) und gegen die Antigenkonzentration aufgetragen, die logarithmisch skaliert war. Eine Linearisierung dieser Darstellung konnte durch die logit-Transformation der B/B_0 -Werte (s. II.7.3) erreicht werden.

Die Standardkurven für (S)- und (R)-Cocclaurin sind in Abbildung 46 in der linearisierten und nichtlinearisierten Form

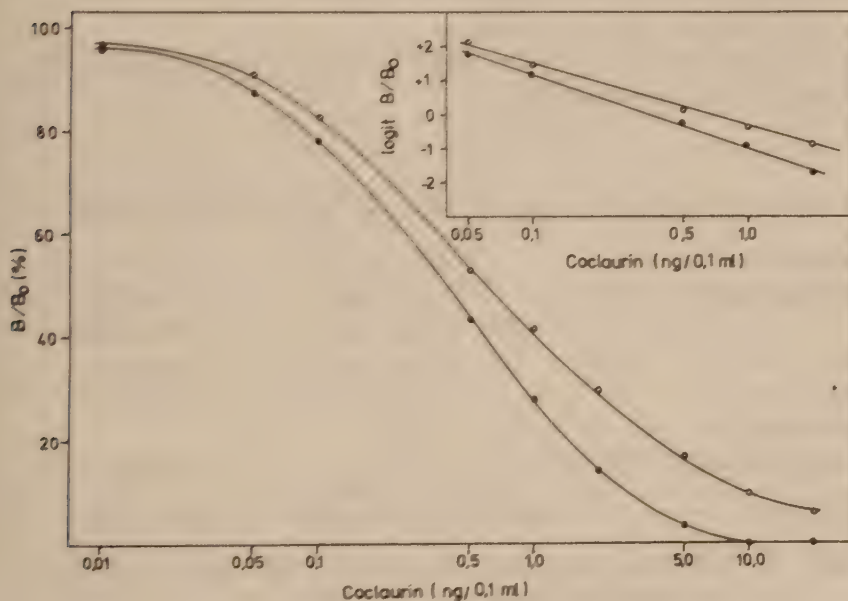


Abb. 46 Standardkurven von (S)-Cocclaurin (●) und (R)-Cocclaurin (○) in zwei möglichen Auftragungen.

dargestellt. Aus ihnen ließen sich folgende charakteristische Parameter des Cocclaurin-Radioimmunttests ableiten (vgl. WEILER, 1977):

- der Meßbereich, der sich aus dem Teil der Standardkurve ergibt, der sich durch die logit-Transformation linearisieren läßt;
- die Nachweisgrenze, die sich aus der Antigenmenge ergibt, für die die Beziehung $B/B_0 = 100\% - 3 \times s_{100\%}$ gilt ($s_{100\%}$ = Standardabweichung von B/B_0 bei $B = B_0$);
- die Antigenmenge, die 50% des markierten Antigens, das in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden war, vom Antikörper verdrängt;
- die unspezifische Bindung;
- die Steigung der logit-Geraden.

Diese Werte sind für die beiden Enatiomere von Cocclaurin in Tabelle 13 zusammengefaßt.

	(S)-Cocclaurin	(R)-Cocclaurin
Meßbereich	0,05 - 2 ng	0,075 - 10 ng
Nachweisgrenze	0,04 ng (= 125 fmol)	0,05 ng (= 156 fmol)
$B/B_0 = 50\%$	0,43 ng	0,55 ng
UB-Werte	4,9%	12,2%
Steigung der logit-Geraden	-2,08	-2,00

Tab. 13 Parameter zur Beschreibung der (S)- und (R)-Cocclaurin-Standardkurven.

Die Werte zeigen, daß die Radioimmunttests für die Bestimmung von (R)- und (S)-Cocclaurin sehr empfindlich sind und einen

Nachweis der beiden Enantiomere bis in den femto-mol-Bereich zulassen. Die hohen UB-Werte, die beim (R)-Cocclaurin-RIA beobachtet wurden, waren der niedrigen Verdünnung (1:5, vgl. III.9.1) des Antiserums zuzuschreiben.

Die Daten aus den Standardkurven ermöglichten eine weitere Charakterisierung der beiden Antiseren durch die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K. Sie ist ein Maß für die Affinität des Antikörpers zum Antigen und läßt sich nach der folgenden Formel berechnen (MÜLLER, 1980):

$$K = \frac{1}{(A - A^*) \times (1 - 1,5b + 0,5b^2)}$$

Dabei bedeutet A die Konzentration an unmarkiertem Antigen und A* die Konzentration an markiertem Antigen bei $B/B_0 = 50\%$, während b den Anteil der gebundenen Radioaktivität bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen wiedergibt.

Für das Antiserum gegen (S)-Cocclaurin wurde K mit $1,5 \times 10^9$ l/mol und für das Antiserum gegen (R)-Cocclaurin mit $0,97 \times 10^9$ l/mol bestimmt. Diese Konstanten deuten auf eine hohe Affinität zwischen dem Antikörper und dem Antigen hin.

9.4 Bestimmung der Kreuzreaktionen

Neben der Empfindlichkeit eines Radioimmuntests ist die Spezifität der Antikörper von ebenso großer Bedeutung. Da Gehaltsbestimmungen mittels Radioimmuntest meist an Rohextrakten durchgeführt werden, muß mit der Anwesenheit von Verbindungen gerechnet werden, die dem Antigen strukturell sehr ähnlich sind. Um auszuschließen, daß diese Substanzen miterfaßt werden und damit das Ergebnis einer Quantifizierung verfälschen, sind Untersuchungen zur Spezifität eines Antikörpers eine essentielle Voraussetzung für die Anwendung eines Radioimmuntests.

Zur Quantifizierung der Kreuzreaktionen strukturell ähnlicher Substanzen wird die Menge der zu testenden Substanz bestimmt, die 50% des markierten Standard-Antigens, in diesem Falle 50% des ^3H -Cocclaurins aus den Antigen-Antikörper-Komplexen verdrängt (entspricht also $B/B_0 = 50\%$). Dieser Wert wird mit der Menge des Standard-Antigens verglichen, für die ebenfalls $B/B_0 = 50\%$ gilt (ABRAHAM, 1975).

Da sich die Molekulargewichte der zu testenden Substanzen häufig stark unterscheiden, ist es von Vorteil, die Werte auf molarer Basis zu vergleichen. Die prozentuale Kreuzreaktion läßt sich dann nach folgender Formel berechnen:

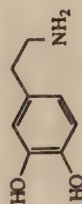
$$\text{KR (\%)} = \frac{\text{Standard-Antigen-Menge bei } B/B_0 = 50\%}{\text{Testsubstanz-Menge bei } B/B_0 = 50\%} \times 100$$

Auf diese Weise wurden 29 Isochinolinalkaloide auf ihre Kreuzreaktionen im (S)- und (R)-Cocclaurin-RIA untersucht. Die Werte, die in Tabelle 14 zusammengestellt sind, ließen folgende Schlußfolgerungen über die Spezifität der Antikörper zu:

1. Die Antikörper scheinen die Stereokonfiguration am C-1-Atom spezifisch zu erkennen, da die Kreuzreaktion zwischen den Enantiomeren des Cocclaurins nur sehr gering ist (weniger als 2,5%). Dies ermöglicht eine selektive Erfassung von (S)- und (R)-Cocclaurin in Rohextrakten.
2. Das Methylierungsmuster des A-Rings eines 1-Benzylisochinolins muß demjenigen von Cocclaurin entsprechen, damit der Antikörper die Substanz bindet. So werden Isococclaurin oder Norcocclaurin vom Antikörper nicht erkannt. Dagegen besitzen alle Substanzen, die im A-Ring zwar eine Cocclaurin-identische Struktur aber im C-Ring ein anderes Substitutionsmuster aufweisen, eine hohe Kreuzreaktivität gegenüber den beiden Antiseren (Bsp. Retikulin, 6-O-Methylaudanosolin). Daher kann angenommen werden, daß der C-Ring nicht in eine Bindung an den Antikörper miteinbezogen und nur der A-Ring spezi-

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Antikörper gegen (S)-Coclaurin	(R)-Coclaurin
----------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	-----------------------------------	---------------

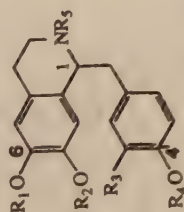
I. Biosynthetische Vorstufen



Dopamin

0 0

II. 1-Benzylisochinoline

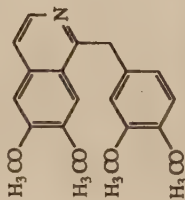


(S)-Coclaurin	CH ₃	H	H	H	H	100	0,7
(R)-Coclaurin	CH ₃	H	H	H	H	2,4	100
(S)-Norcoclaurin	H	H	H	H	H	0,3	0
(R)-Norcoclaurin	H	H	H	H	H	0	1,4
(R,S)-Isococlaurin	H	CH ₃	H	H	H	0	0
(R,S)-Norarmepavin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	0,2	0,9
(R,S)-4'-O-Methylnorarmepavin	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H	0	0
(R,S)-N-Methylcoclaurin	CH ₃	H	H	H	CH ₃	37	73
(R,S)-6-O-Methylaudanosolin	CH ₃	H	OH	H	CH ₃	7,9	12,5
(S)-4'-O-Methylaudanosolin	H	H	OH	CH ₃	CH ₃	0	0
(R)-4'-O-Methylaudanosolin	H	H	OH	CH ₃	CH ₃	0	1,2

Fortsetzung Tab. 14

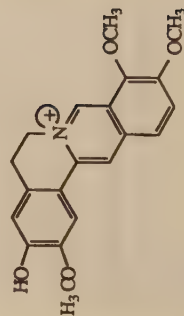
Substanz

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Antikörper gegen (S)-Coclaurin (R)-Coclaurin
(S)-Retikulin	CH ₃	H	OH	CH ₃	CH ₃	9,2
(R)-Retikulin	CH ₃	H	OH	CH ₃	CH ₃	0
(S)-Norretikulin	CH ₃	H	OH	CH ₃	H	16,0
(R)-Norretikulin	CH ₃	H	OH	CH ₃	H	0
(R,S)-Nororientalin	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	11,2
(R,S)-N-Norcodamin	CH ₃	H	OCH ₃	CH ₃	H	0,5
(R,S)-Norprotosinomenin	H	CH ₃	OH	CH ₃	H	19,1
(R,S)-Tetrahydropapaverin	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	4,0
					CH ₃	0,9
						0
						0

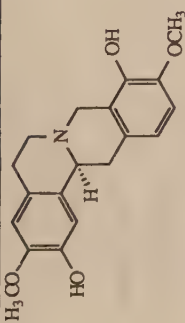


Papaverin

III. Protoberberine



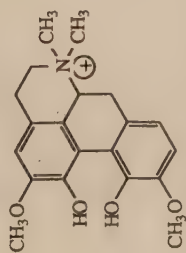
Jatroprorrhizin



Scoulerin

0 0

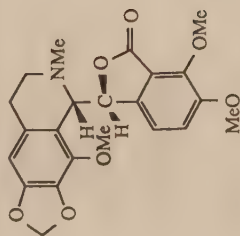
IV. Aporphine



Magnoflorin

0 0

V. Phthalid-Isochinoline



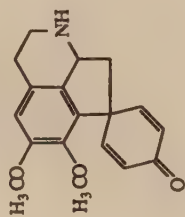
Narcotin

0 0

Fortsetzung Tab. 14
Substanz

Antikörper gegen
(S)-Coclaurin (R)-Coclaurin

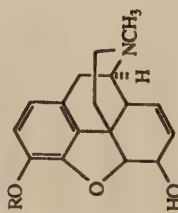
VI. Proaporphine



Stepharin

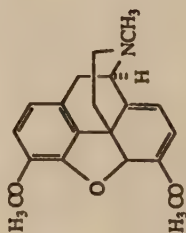
0 0

VII. Morphinane



Codein R=CH₃
Morphin R=H

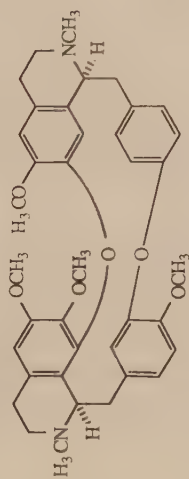
0 0
0 0



Thebain

0 0

VIII. Bisbenzylisochinoline



Isotetrandrin

0 0 0

Tab. 14 Strukturen der Isochinolinalkaloide und ihre Kreuzreaktion im Radioimmunttest zur Bestimmung von (S)- und (R)-Cocclaurin. Die Kreuzreaktionen werden in Prozent auf molarer Basis angegeben.

fisch erkannt wird.

3. Wie bereits vermutet, wurden für N-Methylcocclaurin die höchsten Kreuzreaktionen gefunden. Der Grund dafür ist in der Verknüpfung von Hapten und Protein über das Stickstoffatom zu sehen, weswegen dieser Teil des Moleküls vom Antikörper nicht mehr spezifisch erkannt werden konnte.

4. Alle anderen untersuchten Alkaloide, die nicht den 1-Benzylisochinolininen zugeordnet werden, zeigten keine Kreuzreaktivität im (S)- bzw. (R)-Cocclaurin-RIA.

Diese Ergebnisse bedeuteten für die Anwendung der Cocclaurin-Radioimmunttests, daß Cocclaurin vor einer Gehaltsbestimmung von anderen 1-Benzylisochinolininen, die das gleiche Methylierungsmuster im A-Ring besitzen, abgetrennt werden mußte. Vor allem machte die hohe Kreuzreaktivität von Retikulin ein derartiges Reinigungsverfahren erforderlich. Retikulin war nämlich in fast allen benzyloisochinolinhaltigen Zellkulturen nachgewiesen worden (WIECZOREK, 1985) und würde damit die Quantifizierung von Cocclaurin in Rohextrakten dieser Gewebe völlig verfälschen.

9.5 Nachweis von (S)- und (R)-Cocclaurin in Pflanzen, Pflanzenteilen und Zellkulturen

Um (S)- bzw. (R)-Cocclaurin in Pflanzen, Pflanzenteilen oder Zellkulturen benzyloisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien radioimmunologisch nachzuweisen und zu quantifizieren, mußte das in den Rohextrakten vermutete Cocclaurin zuerst mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) von strukturell ähnlichen und kreuzreagierenden Verbindungen abgetrennt werden (vgl. III.9.4).

Zur Herstellung der Rohextrakte wurden ungefähr 5 g zerkleinertes Gewebe zweimal mit je 20 ml 80%igem Methanol 10 min refluxiert. Nach Filtration wurden die vereinigten Methanol-extrakte in vacuo eingeeengt (40°C). Der Rückstand wurde in 2%igem wässrigem Methanol aufgenommen, auf eine XAD-2-Adsorberharz-Säule (1cm Ø x 6 cm) gegeben und die Alkaloide mit

Methanol (ca. 10 ml) eluiert. Nach Einengen der methanolischen Lösung wurde der Rückstand in 2,0 ml Methanol p.a. aufgenommen und bis zur HPLC-Auftrennung bei -20°C gelagert. Das unter II.12 beschriebene HPLC-System ermöglichte die Abtrennung von Substanzen, mit deren Vorkommen in den Rohextrakten gerechnet werden mußte und die im Cocclaurin-RIA hohe Kreuzreaktionen gezeigt hatten. Zur Bestimmung ihrer Retentionszeiten wurde eine Mischung von 7 Verbindungen, die in den Rohextrakten vermutet wurden, wie unter II.12 beschrieben chromatographiert und das Eluat in 1,5-ml-Fractionen aufgefangen. Bei den aufgetrennten Substanzen handelte es sich um jeweils 4 ng (S)-6-O-Methylnorlaudanolin, (R,S)-6-O-Methylaudanolin, (S)-Cocclaurin, (R,S)-N-Methylcocclaurin, (S)-Norretikulin, (S)-Retikulin und 4 ng (R,S)-Norcocclaurin, das zwar keine Kreuzreaktivität gezeigt hatte, aber dessen Vorkommen in den Rohextrakten vermutet wurde. Die Fractionen wurden im (S)-Cocclaurin-Radioimmunttest untersucht und die Verteilung der Immunreaktivitäten mit dem während des HPLC-Laufs aufgezeichneten UV-Profil verglichen. Wie Abbildung 47 zu entnehmen ist, wurden auf Höhe von (R,S)-6-O-Methylaudanolin, (S)-Cocclaurin, (R,S)-N-Methylcocclaurin, (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin eindeutig Immunreaktionen festgestellt, wobei zwischen den Extinktionsmaxima im UV-Profil und den Immunreaktivitäten keine zeitliche Verschiebung auftrat. Diese beobachteten Kreuzreaktionen entsprachen den unter III.9.4 gefundenen Ergebnissen. Da sich die Retentionszeiten der kreuzreagierenden Substanzen von derjenigen des Cocclaurins um mindestens 1 Minute unterschieden (vgl. Abb. 47), konnte die Cocclaurinfraktion so abgetrennt werden, daß sie keine das Ergebnis des Radioimmunttests verfälschende Verbindungen mehr enthielt.

In ähnlicher Weise wurde bei der Auftrennung der Rohextrakte aus Pflanzen, Pflanzenteilen und Zellkulturen verfahren. Dazu wurden Aliquots von 20 µl unter den gleichen Bedingungen wie die Mischung der 7 Referenzsubstanzen chromatographiert und die Fraktion mit der Retentionszeit von Coc-

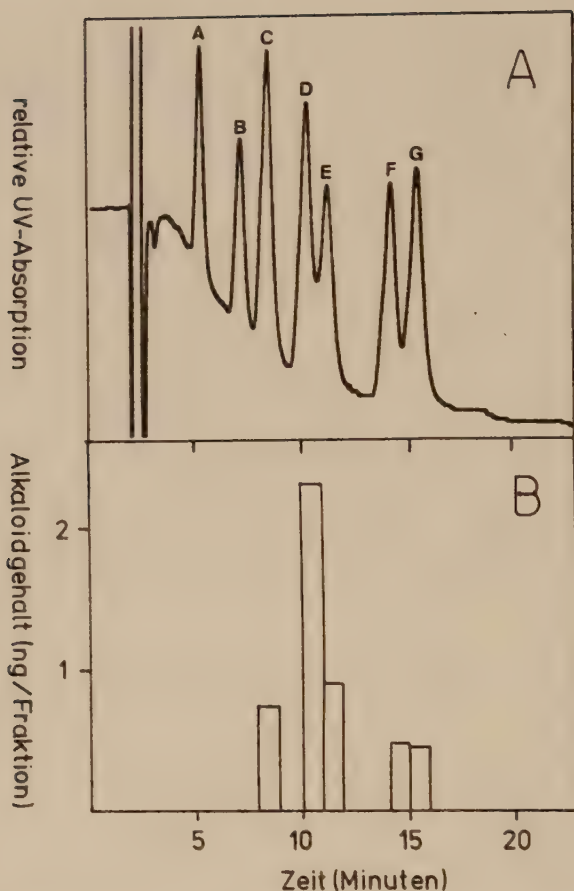


Abb. 47 HPLC-Auftrennung einer Mischung von 7 Referenzsubstanzen. Chromatographische Bedingungen s. II.12.

A. UV-Profil der Mischung; **B.** Verteilung der immunreaktiven Verbindungen, die im Radioimmunttest für (S)-Cocclaurin nachgewiesen wurden, in Abhängigkeit von der Retentionszeit.

Retentionszeit: (R,S)-Norcocclaurin 5,56 min (A), (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin 7,48 min (B), (R,S)-6-O-Methylaudanosolin 8,75 min (C), (S)-Cocclaurin 10,65 min (D), (R,S)-N-Methylcocclaurin 11,65 min (E), (S)-Norretikulin 14,66 min (F), (S)-Retikulin 15,89 min (G).

Der Alkaloidgehalt wurde in ng/Fraktion (=1,5 ml) angegeben.

laurin (10,6 min) aufgefangen. Um zu überprüfen, daß es in den Rohextrakten zu keiner Verschiebung der Retentionszeiten gekommen war, wurde einigen Rohextrakten 10 ng (S)-Cocclaurin zugesetzt und die Zeit bis zum Auftreten des Cocclaurin-Peaks gemessen. Es konnte jedoch auch bei sehr konzentrierten Rohextrakten nur eine minimale zeitliche Verschiebung beobachtet werden. Die vermuteten Cocclaurin-Fractionen der Rohextrakte wurden im (S)- und (R)-Cocclaurin-Radioimmunttest untersucht und der Cocclauringehalt berechnet. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Bestimmungen zusammengefaßt.

In allen der 11 untersuchten Pflanzen, Pflanzenteile oder Zellsuspensionskulturen konnte mit Hilfe dieser Methode das Vorkommen von Cocclaurin nachgewiesen werden. Dabei kamen die beiden Enantiomere meist in gleichen Konzentrationen vor, wie z. B. in den Zellsuspensionskulturen von Barberis stolonifera und Papaver somniferum PQ/49 und in den Blättern von Annona reticulata. Deutlich mehr (R)- als (S)-Cocclaurin wurde in den Blättern von Stephania glabra und in den Keimlingen von Papaver somniferum festgestellt, während in den Zellsuspensionskulturen von Eschscholtzia californica und Corydalis vaginans der Gehalt an (S)-Cocclaurin über dem an (R)-Cocclaurin lag.

Nachdem das Vorkommen von (S)-Cocclaurin in den Keimlingen und älteren Pflanzen von Papaver somniferum nachgewiesen werden konnte, sollte auch Opium auf seinen Gehalt an Cocclaurin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 100 mg Opium wie oben beschrieben extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. In der aufgefangenen Fraktion, die die Retentionszeit des Cocclaurinstandards besaß, konnte ein Gehalt an (R)-Cocclaurin von $4,7 \times 10^{-3} \%$ (TG) und an (S)-Cocclaurin von $9,3 \times 10^{-3} \%$ (TG) gefunden werden.

Damit war eindeutig bestätigt, daß (S)-Cocclaurin ein Bestandteil der Alkaloidfraktion von Papaver somniferum ist. Dieses Ergebnis untermauerte die aufgrund der Resultate der Fütterungsexperimente und enzymatischen Untersuchungen gezogene Schlußfolgerung, daß (S)-Cocclaurin als zentrale Zwi-

Art	Alkaloidgehalt (10^{-3} %TG)	
	(S)-Cocclaurin	(R)-Cocclaurin
<u>Papaveraceae</u>		
Papaver somniferum		
- Keimlinge (Alter: 7 Tage)	0,6	1,4
- Blätter (Alter der Pflanze: 5 Wochen)	2,8	2,7
- Zellsuspensionskultur (PO/49)	1,5	1,5
Eschscholtzia californica		
- Zellsuspensionskultur	0,9	0
<u>Menispermaceae</u>		
Stephania glabra		
- Blätter	0,5	11,0
Tinospora cordifolia		
- Zellsuspensionskultur	3,4	4,5
<u>Fumariaceae</u>		
Corydalis vaginans		
- Zellsuspensionskultur	1,8	0
Dicentra spectabilis		
- Zellsuspensionskultur	2,0	1,2
Fumaria capreolata		
- Zellsuspensionskultur	2,0	1,7
<u>Berberidaceae</u>		
Berberis stolonifera		
- Zellsuspensionskultur	2,3	2,6
<u>Annonaceae</u>		
Annona reticulata		
- Blätter	1,2	1,1

Tab. 15 Gehalt von (S)- und (R)-Cocclaurin in Pflanzen, Pflanzenteilen und Zellsuspensionskulturen verschiedener benzylochinolin-haltiger Pflanzenfamilien ermittelt mit Hilfe des Radioimmuntests. Sofern ein Alkaloidgehalt von 0 angegeben ist, bedeutet dies, daß er unterhalb der Nachweisgrenzen liegt (vgl. III.9.3).

schenstufe der Morphinbiosynthese anzusehen ist.

IV. DISKUSSION

Die Biosynthese der Benzyltetrahydroisochinolinalkaloide ist seit Beginn der sechziger Jahre mit Hilfe von Applikationsexperimenten mit radiomarkierten potentiellen Vorstufen eingehend untersucht worden (Zusammenfassung bei SPENSER, 1968). Die Ergebnisse dieser Experimente und die später erfolgte Charakterisierung der an der Biosynthese von Tyrosin zu Retikulin beteiligten Enzyme (Übersicht s. RÜFFER und ZENK, 1986; ZENK et al., 1985) zeigten deutliche Übereinstimmungen mit Hypothesen über die Biogenese der Benzylisochinoline, die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Winterstein und Trier und Robinson aufgestellt worden waren (WINTERSTEIN und TRIER, 1910; ROBINSON, 1917).

Trotz der Aufklärung der an der Biosynthesekette von Tyrosin zu Norlaudanosolin beteiligten Enzyme blieb jahrelang die Frage offen, warum Dopamin und Dopa bei Applikationsexperimenten nur in die Isochinolinhälfte und nicht wie Tyrosin auch in die Benzylhälfte des Benzylisochinolingerüsts eingebaut werden (vgl. SPENSER, 1968). Wenn Norlaudanosolin - wie von Robinson postuliert - als die universelle Vorstufe der Isochinolinalkaloide anzusehen ist, hätte ein Einbau von Dopa und Dopamin, die im Benzolring jeweils zweifach hydroxyliert sind, in die Benzylhälfte von Norlaudanosolin abgeleiteter Isochinolinalkaloide erfolgen müssen.

Ein Hinweis zur Beantwortung dieser Frage wurde erhalten, als bei Applikationsexperimenten an Berberis stolonifera Zellkultur der Einbau von (S)-Coclaurin und (S)-N-Methylcoclaurin in das Protoberberin Jatrorrhizin beobachtet wurde (STADLER, 1986): Norcoclaurin, Coclaurin und N-Methylcoclaurin sind nicht nur, wie bisher angenommen, Vorstufen von im C-Ring monohydroxylierten Benzylisochinolininen sondern auch von Benzylisochinolinstrukturen, die im Benzylring zwei Hydroxylgruppen besitzen und die sich von Retikulin ableiten. Norcoclaurin, Coclaurin und N-Methylcoclaurin müssen also Vorstufen von Retikulin und damit Vorstufen aller von

Retikulin abgeleiteten Benzylisochinolinstrukturen sein. Mit dieser Schlußfolgerung könnte auch die Erklärung für das oben erwähnte Problem gefunden werden: Dopa und Dopamin können nämlich aus strukturellen Gründen nur in die Isochinolinhälfte des im C-Ring monohydroxylierten Norcocclaurins inkorporiert werden. Betrachtet man Norcocclaurin als die Vorstufe aller von Retikulin abgeleiteter Benzylisochinolinstrukturen, so ist der Einbau von Dopa bzw. Dopamin in die Benzylhälfte dieser Isochinolinalkaloide nicht möglich. Wäre Norlaudanosolin die universelle Vorstufe, hätte dagegen ein entsprechender Einbau in die Benzylhälfte beobachtet werden müssen. Da dies aber nicht der Fall war, kann nicht ausgeschlossen werden, daß Norcocclaurin und nicht Norlaudanosolin das erste Benzylisochinolin in der Biosynthesekette ist.

Um diese Hypothese zu bestätigen und insbesondere zu zeigen, daß Norcocclaurin, Cocclaurin und N-Methylcocclaurin neben den Protoberberinen tatsächlich auch in andere von Retikulin abgeleitete Benzylisochinolinstrukturen inkorporiert werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Applikationsexperimente mit ^{14}C - und ^{13}C -markierten Vorstufen an Keimlingen, älteren Pflanzen und Kapseln von Papaver somniferum durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, daß ^{14}C -markiertes (R,S)-Norcocclaurin (Einbaurate 0,2%), (S)-Cocclaurin (5,7%) und (S)-N-Methylcocclaurin (0,5%) in das Opiumalkaloid Thebain spezifisch eingebaut wurden. Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Norcocclaurin und Cocclaurin und die Applikation von doppelt radiomarkiertem Cocclaurin bewiesen, daß die Vorstufen dabei unverändert in Thebain inkorporiert wurden und daß keine O-De- und/oder Remethylierung stattfand. Ferner konnte in einem Applikationsexperiment an fünf-Wochen-alten Papaver somniferum-Pflanzen der spezifische Einbau von (R,S)-1- ^{13}C -Cocclaurin in Morphin (^{13}C -Anreicherung 3%) nachgewiesen werden (LOEFFLER et al., 1987).

Bei Applikation der (R)-Enantiomere von Cocclaurin und N-Methylcocclaurin an Keimlinge von Papaver somniferum konnte

keinerlei Metabolisierung zu Thebain beobachtet werden. Dies weist darauf hin, daß nur die (S)-Enantiomere von Cocclaurin und Cocclaurinderivaten Vorläufer der Opiumalkaloide sind. Im Gegensatz dazu wurden von Norretikulin und Retikulin sowohl die (R)- als auch die (S)-Enantiomere in Thebain inkorporiert, was mit den Ergebnissen früherer Applikationsexperimente übereinstimmt (BATTERSBY et al., 1965a). Darüber soll an späterer Stelle noch ausführlich diskutiert werden.

Die Ergebnisse der Applikationsexperimente an Papaver somniferum bestätigten das nach dem Einbau von (S)-Cocclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin in die Protoberberine aufgestellte Postulat: (R,S)-Norcocclaurin (es waren bisher nur Untersuchungen mit dem Razemat gemacht worden), (S)-Cocclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin müssen Vorstufen von Retikulin und der von Retikulin abgeleiteten Benzylisochinolinstrukturen sein. So wurde in weiteren Applikationsexperimenten mit radioaktiv markiertem (S)-Cocclaurin auch der Einbau in das Benzophenanthridin Macarpin in Eschscholzia californica Zellkulturen und in Retikulin in Blättern von Annona reticulata und Kalli von Fumaria capreolata nachgewiesen. Ferner konnte nach Applikation einer Mischung von 2,6-³H-Tyrosin und Ring-U-¹⁴C-Tyrosin an Blätter von Annona reticulata gezeigt werden, daß das ³H-¹⁴C-Verhältnis in isoliertem Retikulin und Cocclaurin sowohl für beide Benzylisochinoline identisch war als auch mit dem des applizierten Vorstufengemisches übereinstimmte. Ebenso wurde nach Applikation von Ring-U-¹⁴C-Tyrosin für Cocclaurin und Retikulin die gleiche Radioaktivitätsverteilung zwischen der Isochinolin- und der Benzylhälfte im Benzylisochinolingerüst gefunden (STADLER et al., 1987). Folglich müssen Cocclaurin und Retikulin denselben biogenetischen Ursprung haben.

Auffällig war, daß bei den Applikationsexperimenten an Keimlingen von Papaver somniferum für (R,S)-Norlaudanolin die gleiche - wenn auch im Vergleich äußerst niedrige - Einbaurate in Thebain wie für (R,S)-Norcocclaurin gefunden wurde. Da zu Beginn dieser Arbeit postuliert worden war, daß

Norcoclaurin und nicht Norlaudanosolin die universelle Vorstufe der Benzylisochinoline sei, stellte sich die Frage, warum Norlaudanosolin überhaupt in Thebain inkorporiert wurde. Um dieses Problem zu lösen und um die Rolle von Norcoclaurin und Coclaurin als Vorstufen von Retikulin auf enzymatischem Niveau zu bestätigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Enzyme untersucht, die die Biosynthese von Norcoclaurin zu Retikulin zu katalysieren vermögen. Dabei wurde auch überprüft, inwieweit diese Enzyme mit den Biokatalysatoren identisch sind, die an der Katalyse des bisher postulierten Biosyntheseweges von Norlaudanosolin zu Retikulin beteiligt sind.

Zur enzymatisch katalysierten Bildung von Norcoclaurin waren mit der Reinigung und Charakterisierung der stereospezifischen (S)-Norlaudanosolin-Synthase aus Eschscholzia tenuifolia Suspensionskulturen bereits eingehende Untersuchungen erfolgt (RÜFFER et al., 1981; SCHUMACHER et al., 1983). Dieses Enzym katalysiert nämlich nicht nur die Kondensation von Dopamin mit 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norlaudanosolin, sondern auch diejenige von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norcoclaurin. Ferner wird auch der unsubstituierte Phenylacetaldehyd als Substrat akzeptiert. Die K_M -Werte für den 3,4-Dihydroxy- und den 4-Hydroxyphenylacetaldehyd sind mit 0,71 bzw. 0,87 mM fast identisch.

Aufgrund der wenig ausgeprägten Substratspezifität der (S)-Norlaudanosolin-Synthase muß nun die Frage gestellt werden, welches Produkt durch die Katalyse dieses Enzyms eigentlich im pflanzlichen Gewebe gebildet wird: (S)-Norcoclaurin oder (S)-Norlaudanosolin? Bisher war davon ausgegangen worden, daß es sich nur um Norlaudanosolin handeln könne, da dieses als die universelle Vorstufe der Benzylisochinolinalkaloide angesehen wurde. Auffällig war jedoch, daß Norlaudanosolin noch nie als Intermediat der Benzylisochinolinbiosynthese nachgewiesen wurde. Dagegen konnte das wohl im gleichen Maße

oxidationsempfindliche Norcocclaurin, das auch als Higenamin oder Demethylcocclaurin bezeichnet wird, bereits mehrfach aus Pflanzenmaterial isoliert werden: (R)-Norcocclaurin aus Nelumbo nucifera, Fam. Nymphaeaceae (KOSHIYAMA et al., 1970), (R,S)-Norcocclaurin aus Aconitum japonicum, Fam. Ranunculaceae (KOSUGE und YOKOTA, 1976), (R,S)-Norcocclaurin aus Asiasarum heterotropoides, Fam. Aristolochiaceae (KOSUGE et al., 1978) und (R,S)-Norcocclaurin aus Annona squamosa, Fam. Annonaceae (WAGNER et al., 1980; LEBOEUF et al., 1981a).

Zieht man neben dieser Tatsache die wenig ausgeprägte Substratspezifität der (S)-Norlaudanosolin-Synthase und den weiter oben erwähnten fehlenden Einbau von Dopa und Dopamin in die Benzylhälfte des Benzylisochinolingerüsts in Betracht, so muß angenommen werden, daß es sich bei dem Produkt des kondensierenden Enzyms aus Eschscholzia tenuifolia Zellkulturen höchstwahrscheinlich um (S)-Norcocclaurin und nicht um (S)-Norlaudanosolin handelt. Darum sollte auch eine Umbenennung des Enzyms in (S)-Norcocclaurin-Synthase erfolgen.

Die Aktivität der Norcocclaurin-Synthase konnte im Rahmen dieser Arbeit in einigen benzyloisochinolinhaltigen Zellkulturen und Pflanzen eindeutig nachgewiesen werden, so z.B. in Berberis angulosa-, Eschscholtzia lobbii- und Papaver somniferum (P049)-Suspensionskulturen und in drei-Monate-alten-Pflanzen von Papaver somniferum. Vor allem der Nachweis der von der Norcocclaurinsynthase katalysierten Bildung von Norcocclaurin in Papaver somniferum stützt das Ergebnis der oben genannten Applikationsexperimente, in denen Norcocclaurin als eine Vorstufe der Morphinalkaloide identifiziert worden war. Noch nicht untersucht wurde, ob es sich bei dem Produkt der Norcocclaurin-Synthase in den getesteten pflanzlichen Geweben um (R)- und/oder (S)-Norcocclaurin gehandelt hatte. Die Stereoconfiguration des durch enzymatische Katalyse entstandenen Kondensationsproduktes war nämlich nur für die "frühere" Norlaudanosolinsynthase aus Eschscholzia tenuifolia-, Thalictrum minus- und Meconopsis cambrica-Suspensionskulturen

bestimmt worden (RÜFFER et al., 1981). Da aber ausschließlich das (S)-Enantiomer von Cocclaurin in Retikulin und in das von Retikulin abgeleitete Hydrophenanthren-, Benzophenantridin- und Protoberberingerüst inkorporiert wird, muß man davon ausgehen, daß in pflanzlichen Geweben, in denen diese Benzylisochinoline vorkommen, (S)-Norcocclaurin durch Katalyse einer (S)- oder (R,S)-Norcocclaurinsynthese gebildet wird.

Ungeklärt bleibt auch, warum die Norcocclaurinsynthese nicht in allen Vertretern isochinolinhaltiger Gewebe gefunden wurde. Möglicherweise waren die Enzymaktivitäten zu gering, so daß sie in dem verwendeten, an sich sehr empfindlichen Tritiumausbauteil nicht erfaßt werden konnten.

Da in pflanzlichem Gewebe keine nachweisbaren Mengen an Norlaudanosolin gebildet werden und Norcocclaurin als erstes Benzylisochinolin in der Biosynthesekette anzusehen ist, muß davon ausgegangen werden, daß die Hypothese von HAHN und STIEHL (1936), die vierzig Jahre später von WILSON und COSCIA (1975), Battersby und seinen Mitarbeitern (BATTERSBY et al., 1975) und Scott (SCOTT et al., 1978) wieder aufgegriffen worden war, nicht dem Biosyntheseweg im pflanzlichen Gewebe entspricht. Es war nämlich von Hahn und Stiehl postuliert worden, daß bei der Kondensation eines Phenylethylamins mit einem Phenylpyruvat eine Benzylisochinolin-1-carbonsäure entsteht, die durch oxidative Decarboxylierung in das 1,2-Dehydroderivat und nach Hydrierung in das gewünschte Benzyltetrahydroisochinolin überführt wird. Bei der in vivo Überprüfung dieser Hypothese isolierten WILSON und COSCIA (1975) nach der Applikation von Dopa an Keimlinge und Latex von Papaver orientale angeblich 1-Carboxynorlaudanosolin. Auch in weiteren in vivo (BATTERSBY et al., 1975) und in vitro Versuchen (SCOTT et al., 1978) schien dieses Ergebnis bestätigt zu werden. In der Folge wurde jedoch gezeigt, daß Dopamin und 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat bereits ohne Enzymzusatz zur Norlaudanosolin-1-carbonsäure kondensieren und daß eine oxidative Decarboxylierung des so entstandenen

1-Carboxyisochinolin im leicht basischen Milieu sehr schnell an der Luft (BOBITT et al., 1976) oder durch die im Pflanzenreich weit verbreiteten Laccasen und Peroxidasen (COUTTS et al., 1979) erfolgen kann. Das 1,2-Dehydrobenzylisochinolin kann dann zum Tetrahydrobenzylisochinolin hydriert und in vivo weiter metabolisiert werden, was den von BATTERSBY et al. (1975) beobachteten Einbau von Norlaudanosolin-1-carbonsäure in Morphin erklären würde.

Nachdem nun aber gezeigt wurde, daß im pflanzlichen Gewebe durch die enzymatische Katalyse der Norcocclaurin-Synthase ausschließlich Norcocclaurin und kein Norlaudanosolin oder 1-Carboxynorlaudanosolin gebildet wird, muß angenommen werden, daß es sich bei dem von WILSON und COSCIA (1975) und SCOTT et al. (1978) isolierten 1-Carboxynorlaudanosolin um ein Artefakt oder um eine nicht reine Verbindung gehandelt hatte.

Um das durch die enzymatische Katalyse der (S)- oder (R,S)-Norcocclaurinsynthase gebildete (S)-Norcocclaurin im Biosyntheseweg zum Retikulin in das nachfolgende Zwischenprodukt, das (S)-Cocclaurin zu überführen, muß eine Methylierung in der 6-O-Position von (S)-Norcocclaurin erfolgen. Eine entsprechende Methyltransferaseaktivität konnte im Rahmen dieser Arbeit in vielen Vertretern benzylisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien gefunden werden, wobei allerdings keine Differenzierung zwischen den Stereoisomeren von Norcocclaurin erfolgte. Auffällig war, daß die höchsten Enzymaktivitäten in denselben Familien (Berberidaceae und Papaveraceae) beobachtet wurden, in denen RÜFFER et al. (1983) den höchsten Gehalt an (R,S)-Norlaudanosolin-6-O-Methyltransferase gefunden hatten. Dieses Enzym, das nach der bisherigen Auffassung eine Methylgruppe vom Cosubstrat SAM auf die 6-O-Position von Norlaudanosolin überträgt, entspricht im bisher postulierten Biosyntheseweg in seiner Stellung als auf die (S)-Norlaudanosolinsynthase folgender Biokatalysator der Stellung der (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase in der

hier beschriebenen Biosynthesekette. Auch in seiner Eigenschaft, nicht stereoselektiv zu reagieren, stimmt es mit der Norcocclaurin-6-O-methylierenden Enzymaktivität überein.

Da die (R,S)-Norlaudanolin-6-O-Methyltransferase keine ausgeprägte Substratspezifität besitzt, muß davon ausgegangen werden, daß auch Norcocclaurin als Substrat akzeptiert wird. Dieses Substrat war bei der Reinigung und Charakterisierung der (R,S)-Norlaudanolin-6-O-Methyltransferase aus Argemone platyceras Zellkulturen noch nicht zur Verfügung gestanden. Es konnte auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht getestet werden, da die 6-O-Methyltransferaseaktivität aus Argemone platyceras von einer störenden N-methylierenden Aktivität begleitet war, deren Abtrennung von der O-Methyltransferase sich aufgrund der ähnlichen Eigenschaften sehr schwierig gestaltet (vgl. FRENZEL, 1987).

Weder das Substrat noch das Enzymprodukt der (R,S)-Norlaudanolin-6-O-Methyltransferase, also weder Norlaudanolin noch 6-O-Methylnorlaudanolin, wurden je in pflanzlichem Gewebe nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist, wie Tabelle 16 entnommen werden kann, das Vorkommen von Cocclaurin, des Produktes der Norcocclaurin-6-O-methylierenden Enzymaktivität aus der Literatur bekannt. Zieht man neben dieser Tatsache noch die wenig ausgeprägte Substratspezifität der (R,S)-Norlaudanolin-6-O-Methyltransferase und die weiteren, oben angeführten übereinstimmenden Eigenschaften mit der Norcocclaurin-6-O-methylierenden Enzymaktivität in Betracht, muß gefolgert werden, daß es sich bei dem aus Argemone platyceras Zellkultur gereinigten Enzym nicht um eine (R,S)-Norlaudanolin-6-O-Methyltransferase, sondern um die (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase handelt. Dieses Enzym katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe auf (S)- bzw. (R)-Norcocclaurin und ist somit als der zweite Biokatalysator in der Biosynthesekette von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu Retikulin anzusehen. Seine wenig ausgeprägte Substratspezifität ist der Grund, daß bei Applikation von

Pflanzenart	Cocclaurin	N-Methyl- cocclaurin	Retikulin	Literaturstelle
Annonaceae				
<i>Annona cristalisensis</i>	(R)			FAUST et al., 1981
<i>Annona muricata</i>	(R)	(S)	(S)	LEBOEUF et al., 1981b
<i>Desmos tiebaghiensis</i>		(S)	(S)	LEBOEUF et al., 1982
<i>Xylopia pancheri</i>	(R)		(S)	NIETO et al., 1976
<i>Xylopia papuana</i>			(S)	JOHNS et al., 1968
Hernandiaceae				
<i>Sparattanthelium uncigerum</i>	(R)		(S)	CHALANDRE et al., 1985
Lauraceae				
<i>Atsedaphne archboldiana</i>	(R),(S)		(S)	JOHNS et al., 1967a
<i>Cassytha racemosa</i>	(R)			JOHNS et al., 1967b
<i>Cryptocarya chinensis</i>	(R,S)			LU, 1966
<i>Cryptocarya konishii</i>	(R,S)			LU, 1967
<i>Cryptocarya longifolia</i>	(R)	(R)	(S)	BICK et al., 1981
<i>Litsea lecardii</i>	(R)		(S)	WEBER et al., 1986
<i>Litsea triflora</i>	(R)	(R)	(S)	CASTEDO et al., 1980
<i>Machilus acuminatissimus</i>	(R,S)			LU, 1967
<i>Machilus kusanoi</i>	(R,S)			LU, 1963
Magnoliaceae				
<i>Magnolia liliiflora</i>	(R)			WATANABE, 1986
<i>Magnolia salicifolia</i>	(R)	(R)	(S)	KIMURA et al., 1983
Menispermaceae				
<i>Cocculus laurifolius</i>	(R,S)			TOMITA und KUSUDA, 1952
<i>Sarcopetalum harveyanum</i>	+			SOWEMIMO et al., 1972
Nymphaeaceae				
<i>Nelumbo nucifera</i>		+		KUNITOMO et al., 1973

Fortsetzung Tab. 16
Pflanzenart

Coclaurin	N-Methyl- coclaurin	Retikulin	Literaturstelle
Papaveraceae			
<i>Corydalis gortschakovii</i>			IRGASHEV und ISRAILOV, 1984
<i>Corydalis paniculigera</i>	+		ALIMOVA et al., 1982b
<i>Corydalis stricta</i>		+	IRGASHEV et al., 1983
<i>Fumaria capreolata</i> (Zellkultur)		+	TANAHASHI und ZENK, 1985
<i>Fumaria parviflora</i>	+		ALIMOVA et al., 1982a
<i>Glaucium fimbriiligerum</i>	(R)	(S)	KARIMOVA et al., 1980
<i>Glaucium oxylebium</i>	+		KARIMOVA und ISRAILOV, 1984
Ranunculaceae			
<i>Thalictrum dioicum</i>	(R)		SHAMMA und ROTHENBERG, 1978
<i>Thalictrum revolutum</i>	+	+	WU et al., 1977
Rhamnaceae			
<i>Discaria crenata</i>			PACHECO et al., 1973
<i>Discaria pubescens</i>			PANICHANUN und BICK, 1984
<i>Discaria serratifolia</i>	(R)		TORRES et al., 1979
<i>Discaria toumatou</i>	(R)		PANICHANUN et al., 1982
<i>Phyllica rogersii</i>	(R)		ARNDT, 1963
<i>Zizyphus jujuba</i>	+		OTSUKA et al., 1974

Tab. 16

Vorkommen von Coclaurin, N-Methylcoclaurin und Retikulin in pflanzlichem Gewebe.
Sofern in der Literatur die Stereokonfiguration beschrieben war, ist sie in der
Tabelle angegeben (sonst nur Kennzeichnung durch +). Für Retikulin ist nur das
gleichzeitige Vorkommen mit Coclaurin und/oder N-Methylcoclaurin angeführt.

radiomarkiertem Norlaudanolin an Vertreter benzylisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien die Methylierung von Norlaudanolin zu 6-O-Methylnorlaudanolin und die weitere Metabolisierung zu den jeweiligen Benzylisochinolinstrukturen, wie z.B. den Morphinalkaloiden erfolgt. In vivo sollte jedoch aus den oben genannten Gründen wohl keine Bildung von Norlaudanolin und 6-O-Methylnorlaudanolin stattfinden.

Die nächste Stufe in der Biosynthese zu Retikulin muß entweder in einer N-Methylierung von (S)-Coclaurin zu (S)-N-Methylcoclaurin oder in einer Hydroxylierung von (S)-Coclaurin zu (S)-3'-Hydroxycoclaurin bestehen. Welcher der beiden möglichen Wege eingeschlagen wird, war aus den Ergebnissen der Applikationsexperimente jedoch nicht ersichtlich. Zwar war ein Einbau von (S)-N-Methylcoclaurin in Thebain erfolgt und auch - wie bereits erwähnt - in die Protoberberine beobachtet worden (STADLER, 1986), doch fehlten zum Vergleich Fütterungsexperimente mit radiomarkiertem 3'-Hydroxycoclaurin. Aus diesem Grund mußten die beiden in Frage kommenden Enzyme - eine hydroxylierende und eine N-methylierende Aktivität - genau untersucht werden. Ihre Substratspezifität mußte nämlich den Hinweis darauf liefern, ob zuerst eine N-Methylierung oder eine Hydroxylierung auf dem Weg zu Retikulin stattfindet.

Untersuchungen auf eine Coclaurin-N-methylierende Aktivität ergaben, daß in fast allen getesteten Vertretern benzylisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien eine derartige Enzymaktivität nachzuweisen war. Diese differenzierte dabei in der Mehrzahl der Fälle, wie z.B. bei Berberis stolonifera Zellkulturen, nicht zwischen den Stereoisomeren von Coclaurin. Nur bei einigen Vertretern der Menispermaceae, wie z.B. bei Tinospora cordifolia zeigte die hier gefundene N-Methyltransferase eine absolute (S)-Stereoselektivität.

Dieser Unterschied in der Stereoselektivität läßt sich folgendermaßen erklären: In Berberis stolonifera Zellkulturen wird (S)-Coclaurin über (S)-N-Methylcoclaurin in die Proto-

berberine und in die eine Hälfte des Bisbenzylisochinolins Berbamunin überführt. Gleichzeitig wird aber auch (R)-Cocclaurin über (R)-N-Methylcocclaurin zu den Bisbenzylisochinolinen metabolisiert (vgl. STADLER, 1986). Folglich muß hier sowohl eine (S)- wie auch eine (R)-Cocclaurin-N-methylierende Enzymaktivität vorhanden sein. Für Tinospora cordifolia Suspensionskulturen wird dagegen angenommen, daß (R)-Cocclaurin ohne vorherige N-Methylierung zu dem Proaporphin Stepharin umgesetzt wird (vgl. BHAKUNI et al., 1983), während (S)-Cocclaurin nach N-Methylierung zu den Protoberberinen metabolisiert wird. Aus diesem Grund war bei Tinospora cordifolia Zellkultur nur eine (S)-Cocclaurin-N-methylierende Enzymaktivität beobachtet worden.

Die Reinigung zweier verschiedener N-Methyltransferasen aus Berberis koetianeana-Zellkulturen hatte ergeben, daß diese beiden Enzyme neben einer fehlenden Stereoselektivität auch keine ausgeprägte Substratspezifität aufweisen (FRENZEL, 1987). So wurden u.a. neben (R)- und (S)-Cocclaurin auch (R)- und (S)-3'-Hydroxycocclaurin umgesetzt. Die Unterschiede in den relativen Enzymaktivitäten waren dabei nicht signifikant genug, um eine Aussage über die Abfolge von N-Methylierung und Hydroxylierung im Berberis-Gewebe machen zu können.

Im Gegensatz dazu wurde bei der aus Tinospora cordifolia Suspensionskultur 115-fach angereicherten (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase eine ausgeprägte Substratspezifität und - wie oben bereits erwähnt - Stereoselektivität festgestellt: nur (S)-Cocclaurin und (S)-Norcocclaurin dienten als Substrate, während (S)-3'-Hydroxycocclaurin nicht umgesetzt wurde. Daher ist anzunehmen, daß in der Zellkultur von Tinospora cordifolia (S)-Cocclaurin zuerst N-methyliert und anschließend hydroxyliert wird. Es ist jedoch nicht möglich, von diesem Ergebnis aus auf die Biosynthesewege in anderen Zellkulturen zu schließen, da sich die N-Methyltransferasen in den jeweiligen Kulturen - wie am Beispiel von Berberis koetianeana zu sehen ist - in ihrer Substratspezifität stark unterscheiden können.

Nachdem die Substratspezifität der N-Methyltransferasen keine allgemeinen Aussagen über die Abfolge der N-Methylierung und Hydroxylierung zuließ, mußte die Enzymaktivität, die (S)-Coclaurin oder (S)-N-Methylcoclaurin zum entsprechenden zweifach hydroxylierten Produkt umsetzt, gereinigt und charakterisiert werden. Als Quelle für die Isolierung dieses Enzyms wurde die Suspensionskultur von Berberis stolonifera gewählt, da hier ein bedeutender Einbau von (S)-Coclaurin und (S)-N-Methylcoclaurin in die Protoberberine beobachtet worden war und folglich meßbare Mengen an hydroxylierender Enzymaktivität vorhanden sein mußten. Statt der erwarteten substratspezifischen Hydroxylase, wie z.B. einer mikrosomalen Hydroxylase oder einer α -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenase, konnte aber nur die Aktivität einer Phenolase gefunden werden.

Dieses Enzym zeigte, wie es für Phenolasen allgemein bekannt ist (vgl. WEST, 1980), keine ausgeprägte Substratspezifität: So setzte die zur Homogenität gereinigte Phenolase nicht nur die Benzylisochinoline Coclaurin und N-Methylcoclaurin, sondern auch deren biosynthetische Vorstufen Tyrosin und Tyramin um. Ferner differenzierte das Enzym nicht zwischen den beiden Enantiomeren von Coclaurin (die Enantiomere von N-Methylcoclaurin waren als Substrate nicht zur Verfügung gestanden). Auch lagen die K_M -Werte der getesteten Substrate sehr nahe beieinander (K_M -Wert Tyramin 0,29 mmol/l, (R,S)-N-Methylcoclaurin 0,58 mmol/l, (R)-Coclaurin 0,63 mmol/l, (S)-Coclaurin 0,75 mmol/l, Tyrosin 0,83 mmol/l).

Aus diesem Grund können keine genauen Aussagen über das physiologische Substrat für die Phenolase gemacht werden. Es muß sogar davon ausgegangen werden, daß die Phenolase in vitro Norcoclaurin zu 3'-Hydroxynorcoclaurin (Norlaudanosolin) umsetzt. Da aber nach dem hier aufgezeigten Biosyntheseweg in pflanzlichem Gewebe kein Norlaudanosolin gebildet wird, sollte diese Umsetzung in vivo nicht erfolgen. Aus diesem Grund muß der von der Phenolase katalysierte Biosyntheseschritt wohl intrazellulär kompartimentiert sein. Da

für die (S)-Norcocclaurinsynthase und die (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase keine Kompartimentierung bekannt ist (vgl. ZENK et al., 1985), könnte so verhindert werden, daß das durch die Katalyse der Norcocclaurinsynthase gebildete Norcocclaurin in vivo zu Norlaudanosolin hydroxyliert wird. Einen Hinweis auf eine mögliche Kompartimentierung der Phenolase könnte das niedrige pH-Optimum (pH 6,0) des Enzyms liefern. So ist für alle nicht kompartimentierten Enzyme, die an der Biosynthese von Norcocclaurin zu Retikulin beteiligt sind, ein pH-Optimum von über 7,0 beschrieben: (S)-Norcocclaurinsynthase pH 7,8, (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase pH 7,5, (S)-Cocclaurin-N-Methyltransferase aus Tinospora cordifolia Zellkulturen pH 8,6, (S)-6-O-Methyllaudanosolin-4'-O-Methyltransferase (oder (S)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'-O-Methyltransferase) pH 8,3 - 8,5 (vgl. ZENK et al., 1985; FRENZEL, 1987). Ferner ist aus der Literatur bekannt, daß Phenolasen in differenzierten Pflanzen häufig in Zellorganellen wie den Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert sind (MAYER und HAREL, 1979; Mayer, 1987). Dabei sind sie meist direkt mit den Thylakoidmembranen oder Mitochondrien assoziiert (vgl. PARISH, 1972). Wie fest die Phenolasen dabei an die Membranen gebunden sind, ist je nach Gewebe und nach Entwicklungszustand der Pflanze sehr verschieden, so daß zur Solubilisierung der Phenolase nicht immer die Verwendung von Detergentien notwendig ist (MAYER und HAREL, 1979).

Für Phenolasen aus Zellkulturen sind bis jetzt nur wenige Untersuchungen über eine Kompartimentierung dieser Enzyme bekannt. Doch konnte an Suspensionskulturen von Nicotiana tabacum gezeigt werden, daß die in der Kultur nachgewiesene Phenolase mit den Thylakoidmembranen assoziiert ist (BAR-NUN und Mayer, 1983). Eine ähnliche Lokalisation, allerdings nicht in Chloroplasten, könnte eventuell auch für die hier untersuchte Phenolase aus Berberis stolonifera Suspensionskulturen in Betracht kommen. AMANN et al. (1986) hatten nämlich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen einer

Berberis wilsoniae-Suspensionskultur gezeigt, daß 7% des cytoplasmatischen Raumes auf Proplastiden und 4% auf Mitochondrien entfallen. Es wäre denkbar, daß die Phenolase aus Berberis stolonifera Zellkultur in solchen Proplastiden oder Mitochondrien lokalisiert ist, was mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation noch untersucht werden müßte.

Wird eine Kompartimentierung der Phenolase postuliert, so kann ausgeschlossen werden, daß das durch Katalyse der nicht kompartimentierten (S)- oder (R,S)-Norcocclaurinsynthase gebildete (S)-Norcocclaurin zu (S)-Norlaudanosolin hydroxyliert wird. Dagegen kann (S)-Norcocclaurin - wie bereits beschrieben - durch Katalyse der (R,S)-Norcocclaurin-6-O-Methyltransferase zu (S)-Cocclaurin methyliert und nach N-Methylierung, Hydroxylierung und O-Methylierung in (S)-Retikulin überführt werden. In welcher Reihenfolge diese drei letzten Biosyntheseschritte ablaufen, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Aus diesem Grund kommen, wie in Abbildung 48 zu sehen ist, im Anschluß an die Kondensation von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Norcocclaurin und dessen Methylierung zu (S)-Cocclaurin für die Biosynthese zu (S)-Retikulin drei alternative Wege in Frage:

1. Weg: (S)-Cocclaurin wird zuerst durch Katalyse einer N-Methyltransferase N-methyliert, im Anschluß durch Katalyse der Phenolase in der 3'-Position hydroxyliert und zuletzt durch Katalyse der von FRENZEL (1987) aus Berberis koetiana Suspensionskulturen gereinigten und charakterisierten (S)-6-O-Methyllaudanosolin-4'-O-Methyltransferase an der 4'-O-Position zu (S)-Retikulin methyliert.

Dieses letzte Enzym, das im hier aufgezeigten Biosyntheseweg als (S)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'-O-Methyltransferase bezeichnet werden muß, reagiert absolut (S)-stereoselektiv. Dies erklärt, warum in den Applikationsexperimenten an Papaver somniferum nur die (S)-Enantiomere von Cocclaurin und N-Methylcocclaurin zu den Opiumalkaloiden metabolisiert wurden.

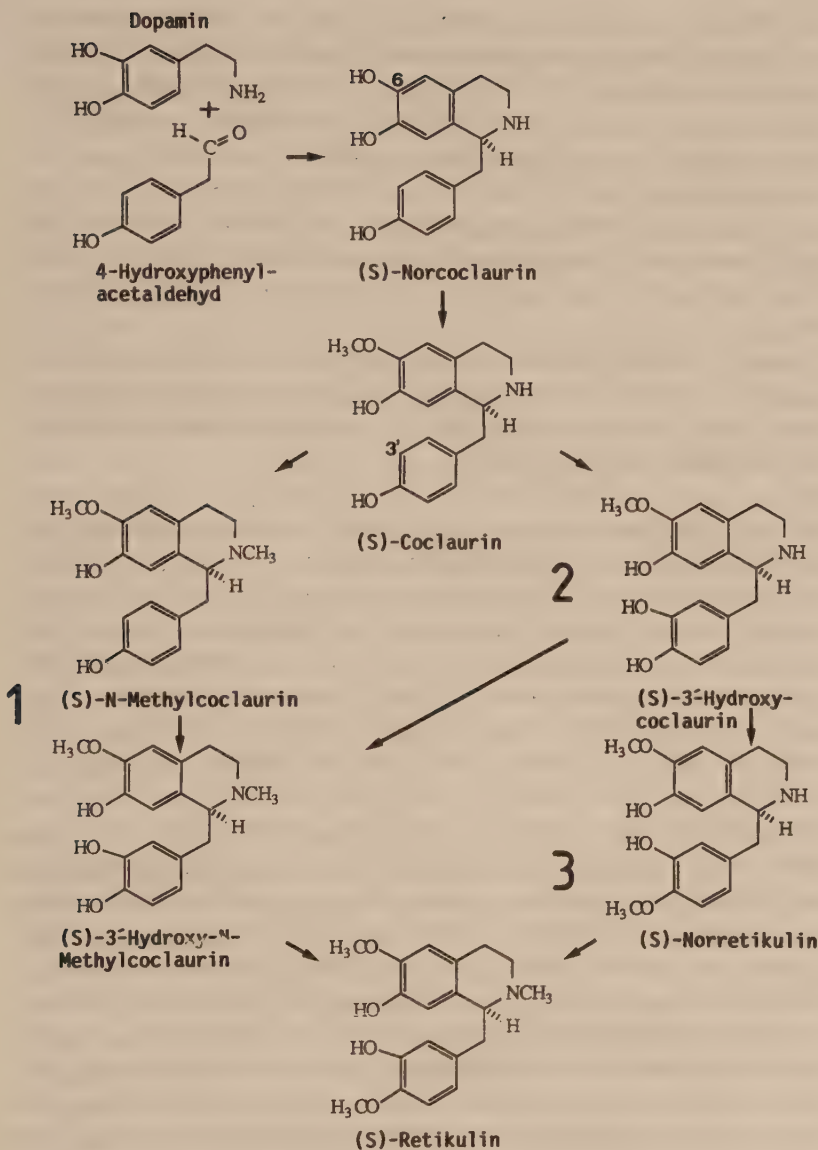


Abb. 48 Biosynthesewege von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (S)-Retikulin. Die Zahlen stehen für die im Text diskutierten möglichen Biosynthesewege.

(R)-Cocclaurin kann zwar durch Katalyse der nicht stereoselektiven N-Methyltransferasen und Phenolase zu (R)-3'-Hydroxycocclaurin bzw. (R)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin, aber nicht weiter zu (R)-4'-O-Methyl-3'-Hydroxycocclaurin ((R)-Norretikulin) bzw. (R)-Retikulin umgesetzt werden.

2. Weg: (S)-Cocclaurin wird zuerst in der 3'-Position hydroxyliert, anschließend N-methyliert und in der 4'-O-Position methyliert. Der letzte Biosyntheseschritt des zweiten Weges ist folglich mit der dritten Umsetzung im ersten Weg identisch.

3. Weg: (S)-Cocclaurin wird wie bei der zweiten Alternative zuerst in 3'-Stellung hydroxyliert, aber dann 4'-O-methyliert und das so entstandene (S)-Norretikulin zuletzt zu (S)-Retikulin N-methyliert.

Von den drei aufgezeigten möglichen Biosyntheseketten von (S)-Cocclaurin zu (S)-Retikulin scheint der erste Weg aus folgenden Gründen der wahrscheinlichste zu sein: N-Methylcocclaurin, das im zweiten und dritten Biosyntheseweg nicht als Intermediat auftritt, wurde in pflanzlichem Gewebe bereits mehrfach nachgewiesen. Dabei konnten in einigen Fällen sogar die Kombinationen Cocclaurin/N-Methylcocclaurin, N-Methylcocclaurin/Retikulin und Cocclaurin/N-Methylcocclaurin/Retikulin isoliert werden (vgl. Tabelle 16). Vor allem das gleichzeitige Auftreten von Retikulin, N-Methylcocclaurin und Cocclaurin (Cryptocarya longifolia, Litsea triflora, Magnolia salicifolia) gibt einen Hinweis darauf, daß die Biosynthese von Cocclaurin zu Retikulin über das Intermediat N-Methylcocclaurin verlaufen könnte. Die Zwischenprodukte des zweiten und dritten möglichen Biosyntheseweges, 3'-Hydroxycocclaurin (bisher 6-O-Methylnorlaudanosolin) und das chemisch sehr stabile 3'-Hydroxy-4'-O-Methylcocclaurin (Norretikulin), waren bisher nie aus pflanzlichem Gewebe isoliert worden. Allerdings muß dazu einschränkend angemerkt werden, daß dieser Nachweis auch für 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin, das auf (S)-N-Methylcocclaurin folgende Produkt im ersten Biosyn-

theseweg, bis jetzt noch nicht gelungen ist.

Für den ersten vorgeschlagenen Biosyntheseweg spricht aber auch die Tatsache, daß die (S)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin-4'-O-Methyltransferase (S)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin besser umsetzt als die entsprechende Nor-Verbindung (Umsatzrate (S)-3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin 100%, (S)-3'-Hydroxycocclaurin 10%; FRENZEL, 1987). Dieses Argument gilt natürlich auch für den zweiten möglichen Biosyntheseweg, da hier ebenfalls die 4'-O-Methylierung auf der Stufe von 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin stattfindet.

Die hier genannten Gründe, die für den ersten vorgeschlagenen Biosyntheseweg sprechen, dürfen jedoch nur als Hinweise angesehen werden. Die enzymatischen Untersuchungen, von denen man sich ausgehend von Applikationsexperimenten eine Offenlegung der genauen biosynthetischen Vorgänge in der Pflanzenzelle erhofft hatte, hatten zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt. Eine klare Aussage, welcher der drei möglichen Biosynthesewege im pflanzlichen Gewebe abläuft, läßt sich erst dann machen, wenn die Abfolge der beiden Methylierungsschritte und der Hydroxylierung unter Berücksichtigung der Kompartimentierung und vorhandener Poolgrößen der daran beteiligten Stoffe - möglichst mit Hilfe von in vivo Experimenten - bestimmt wird.

Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, ist Cocclaurin bereits mehrfach aus pflanzlichem Gewebe isoliert worden. Für die meisten Vertreter benzylisochinolinhaltiger Pflanzenfamilien stand dieser wichtige Nachweis des chemisch stabileren Cocclaurins als Intermediat der Benzylisochinolinbiosynthese aber noch aus. Aus diesem Grund wurde für die beiden Enantiomere von Cocclaurin ein Radioimmuntest aufgebaut. Dieser zeichnete sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus und erlaubte eine Bestimmung von (R)- bzw. (S)-Cocclaurin bis 0,05 ng (156 fmol) bzw. 0,04 ng (125 fmol). Daneben wiesen die gegen (R)- und (S)-Cocclaurin gerichteten Antikörper aber eine starke Kreuzreaktivität gegenüber allen 1-Benzylisochi-

nolinen auf, die im A-Ring dasselbe Methylierungsmuster wie Cocclaurin besitzen. Deswegen mußten vor der radioimmunologischen Bestimmung von (R)- und (S)-Cocclaurin aus den zu untersuchenden Rohextrakten alle kreuzreagierenden Verbindungen mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie abgetrennt werden. Auf diese Weise konnte dann das Vorkommen von (S)-, aber auch von (R)-Cocclaurin z.B. in den Rohextrakten von Keimlingen und älteren Pflanzen von Papaver somniferum, in Berberis stolonifera Suspensionskultur und in Opium nachgewiesen werden. Damit war der Beweis erbracht, daß (S)-Cocclaurin ein Bestandteil der Alkaloidfraktion von Papaver somniferum und Berberis stolonifera ist, und nochmals bestätigt worden, daß (S)-Cocclaurin neben (S)-Norcocclaurin ein zentrales Zwischenprodukt der Benzylisochinolinbiosynthese ist.

In fast allen untersuchten Rohextrakten, wie z.B. demjenigen von Berberis stolonifera, kamen die beiden Enantiomere von Cocclaurin in gleichen Konzentrationen vor. Dies deutet darauf hin, daß in diesen Geweben zwei verschiedene Biosynthesewege von Cocclaurin oder von dessen biosynthetischer Vorstufe Norcocclaurin ausgehen können. So führt in Berberis stolonifera Zellkultur - wie bereits erwähnt - ein Weg von (R)-Cocclaurin über (R)-N-Methylcocclaurin zu den Bisbenzylisochinolininen und der andere von (S)-Cocclaurin über (S)-N-Methylcocclaurin zu den Protoberberinen (und teilweise auch zu bestimmten Bisbenzylisochinolininen). In Tinospora cordifolia Zellkultur wird (S)-Cocclaurin ebenfalls über (S)-N-Methylcocclaurin zu den Protoberberinen, aber gleichzeitig (R)-Cocclaurin zu dem Proaporphin Stepharin metabolisiert. Ferner ist aus Applikationsexperimenten bekannt, daß (R)-Cocclaurin u.a. auch eine Vorstufe der Bisbenzylisochinoline Oxyacanthin (BHAKUNI et al., 1978a), Tiliacarin (BHAKUNI et al., 1978b) und Isotetrandrin (BHAKUNI et al., 1980) und des Proaporphins Crotonosin (HAYNES et al., 1965) darstellt. Aufgrund dieser Befunde stellt sich nun die Frage: Wie kann (R)-Cocclaurin biosynthetisch entstehen? In dem oben be-

schriebenen Biosyntheseweg von (S)-Norcocclaurin zu (S)-Retikulin wird nämlich nur (S)-Cocclaurin ausgehend von (S)-Norcocclaurin gebildet. Deswegen müssen zur Beantwortung dieser Frage folgende zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. (S)-Cocclaurin oder (S)-Norcocclaurin werden analog dem von BATTERSBY et al. (1965) für die Bildung von (R)-Retikulin postulierten Oxidations-Reduktions-System über die Zwischenstufe 1,2-Dehydrococclaurin bzw. 1,2-Dehydronorcocclaurin in (R)-Cocclaurin bzw. (R)-Norcocclaurin überführt.

In diesem Fall hätte bei den Applikationsexperimenten an Tinospora cordifolia Zellkultur der Einbau von (S)-Cocclaurin in das Proöporphin Stepharin beobachtet werden müssen. Da dies nicht der Fall war und nur (R)-Cocclaurin in Stepharin inkorporiert wurde, muß die erste Möglichkeit ausgeschlossen werden.

2. Es existiert neben der (S)-Norcocclaurinsynthese ein zweites Enzym, das die Kondensation von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu (R)-Norcocclaurin oder zu (R,S)-Norcocclaurin katalysiert.

Diese zweite Möglichkeit scheint die wahrscheinlichste zu sein, obwohl bis jetzt noch keine Hinweise auf ein derartiges Enzym erhalten werden konnten (SCHUMACHER et al., 1983).

Das im Biosyntheseweg von Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd über (S)-Norcocclaurin und (S)-Cocclaurin entstehende (S)-Retikulin wird ebenso wie sein (R)-Enantiomer in die Morphinalkaloide inkorporiert. Dieser Einbau beider Retikulin-Enantiomere, der erstmals von Battersby und seinen Mitarbeitern beobachtet wurde (BATTERSBY et al., 1965a), konnte auch bei Applikationsexperimenten an Keimlingen von Papaver somniferum mit ^{14}C -markiertem (R)- und (S)-Retikulin nachgewiesen werden. Aufgrund des Einbaus beider Retikulin-Enantiomere hatten Battersby et al. gefolgert, daß (S)-Retikulin über die Zwischenstufe 1,2-Dehydroretikulin in einem rever-

siblen Oxidations-Reduktions-System in (R)-Retikulin überführt wird, welches die mit den Morphinalkaloiden übereinstimmende Stereokonfiguration am C-1-Atom besitzt. Auffällig war allerdings, daß Battersby et al. nach der Applikation von (R)- und (S)-Retikulin, die am C-1-Atom eine Tritiummarkierung und an drei weiteren Positionen im Molekül ^{14}C -Markierungen trugen, an Papaver somniferum nicht nur beim (S)-Enantiomer, sondern auch bei (R)-Retikulin einen Ausbau der Tritiummarkierung am C-1-Atom feststellten. Dieser betrug für (R)-Retikulin zwischen 42% und 68%, für das (S)-Enantiomer 82% - 87%. Als Grund, warum bei (S)-Retikulin während der Metabolisierung zu den Opiumalkaloiden kein vollständiger Ausbau der Tritiummarkierung am C-1-Atom erfolgt war, wurde von Battersby angegeben, daß durch eine Übertragung der Tritiummarkierung durch das "Oxidations-Reduktions-Enzym" auf 1,2-Dehydroretikulin eine kleine Menge an (R)-1- ^3H -Retikulin (15%) gebildet worden sei.

Um zu überprüfen, ob bei der Metabolisierung von (S)-Retikulin zu den Morphinalkaloiden tatsächlich nicht die gesamte Tritiummarkierung am C-1-Atom im obigen Sinne ausgebaut wird bzw. bei (R)-Retikulin vollständig erhalten bleibt, wurden an Keimlinge von Papaver somniferum (R)- und (S)-1- ^{13}C , 1- ^2H -Norretikulin und (R)- und (S)-1- ^{13}C , 1- ^2H -Retikulin appliziert. Nach Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren und CI-Massenspektren des isolierten markierten Thebains konnte - im Rahmen der Meßgenauigkeit - gezeigt werden, daß bei der Metabolisierung zu Thebain das Deuterium am C-1-Atom der (R)-Enantiomere vollständig erhalten blieb, während das Deuterium am C-1-Atom von (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin vollständig ausgebaut wurde. Es wurde also weder ein Deuterium-Verlust am C-1-Atom der (R)-Enantiomere noch ein unvollständiger Ausbau des Deuteriums am C-1-Atom der (S)-Enantiomere beobachtet. Deswegen muß angenommen werden, daß die von BATTERSBY et al. (1965a) beschriebenen Ergebnisse nicht korrekt waren und möglicherweise mit der Methode zusammenhängen, die für den Abbau der radiomarkierten Opiumal-

kaloide angewandt worden war.

Aufgrund der Ergebnisse der Applikationsexperimente und der enzymatischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, muß angenommen werden, daß in pflanzlichem Gewebe - im Gegensatz zur bisherigen Annahme - kein Norlaudanosolin gebildet wird und daß es somit keine Vorstufe von Retikulin darstellt. Vielmehr ist Norcoclaurin, das durch Katalyse der (S)-Norcoclaurinsynthase aus Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd entsteht, als das prinzipielle und erste Benzylisochinolin in der Biosynthesekette zu (S)-Retikulin anzusehen. Dieser Befund konnte durch die Charakterisierung der Enzyme, die die Biosyntheseschritte von (S)-Norcoclaurin über (S)-Coclaurin zu (S)-Retikulin katalysieren, bestätigt werden. Ferner wurde (S)-Coclaurin als Intermediat der Benzylisochinolinbiosynthese im Gewebe benzylisochinolinhaltiger Pflanzen und Zellkulturen mit Hilfe radioimmunologischer Methoden nachgewiesen.

Aus diesem Grund muß der bisher postulierte Biosyntheseweg, der von (S)-Norlaudanosolin zu (S)-Retikulin führt (vgl. Abb. 5), revidiert und durch die in Abbildung 48 dargestellte Biosynthesekette ersetzt werden. Wie anfangs bereits postuliert, stellt (S)-Norcoclaurin folglich die universelle Vorstufe aller von Retikulin abgeleiteten Benzylisochinolinstrukturen dar. Damit ist auch das Problem gelöst, warum Dopa und Dopamin bei Applikationsexperimenten nur in die Isochinolinhälfte der Benzylisochinolinalkaloide inkorporiert wurden (vgl. SPENSER, 1968): Ein Einbau dieser zweifach hydroxylierten Vorstufen in Norcoclaurin und in alle von Norcoclaurin und damit von Retikulin abgeleiteten Benzylisochinoline ist nur in die Isochinolinhälfte möglich.

Mit der Revision des Biosyntheseweges zu Retikulin können jetzt Versuchsergebnisse interpretiert werden, für die seit den ersten Applikationsexperimenten mit radiomarkierten Vorstufen in den sechziger und siebziger Jahren keine Erklärung gefunden worden waren. Gleichzeitig mit der Lösung

dieses schon jahrelang ungeklärten Problems, haben sich aber auch wieder neue Fragen ergeben. So bleibt vorerst offen, wie (R)-Norcocclaurin oder (R)-Cocclaurin, die wichtige Vorstufen der Bisbenzylisochinolinalkaloide und der Proaporphine sind, in pflanzlichem Gewebe entstehen. Auch steht noch der Nachweis von 3'-Hydroxy-N-Methylcocclaurin als einem Intermediat des in dieser Arbeit aufgezeigten Biosyntheseweges aus. Erst wenn dieser Nachweis gelungen und die Reihenfolge der enzymatisch katalysierten Methylierungen und der Hydroxylierung bestimmt sind, kann die Biosynthesekette von 4-Hydroxyphenylacetaldehyd und Dopamin zu (S)-Retikulin als lückenlos aufgeklärt betrachtet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei Untersuchungen zur Biosynthese der Morphinalkaloide konnte mit Hilfe von Applikationsexperimenten mit ^{14}C -markierten, potentiellen Vorstufen an Keimlingen, älteren Pflanzen und Kapseln von Papaver somniferum gezeigt werden, daß (R,S)-Norcocclaurin, (S)-Cocclaurin und (S)-N-Methylcocclaurin spezifisch in Thebain inkorporiert werden. Experimente mit ^{13}C -markierten Vorstufen und doppelt radiomarkiertem (R,S)-Cocclaurin bestätigten, daß der Einbau der oben genannten Verbindungen in Thebain ohne Veränderung am Kohlenstoffskelett erfolgt. Damit ist Norcocclaurin als biosynthetische Vorstufe der Opiumalkaloide bewiesen.
2. Mit Hilfe von Applikationsexperimenten mit (R)- und (S)- $1\text{-}^{13}\text{C}$, $1\text{-}^2\text{H}$ -Norretikulin und Retikulin an Keimlingen von Papaver somniferum wurde nachgewiesen, daß bei der Metabolisierung zu Thebain das am C-1-Atom befindliche Deuterium der (R)-Enantiomere erhalten bleibt, während es bei den (S)-Enantiomeren ausgebaut wird.
3. Die Norcocclaurinsynthese (Dopamin:p-Hydroxyphenylacetaldehyd (Norcocclaurin) Synthase; E.C. 4.1.2.), die die Kondensation von Dopamin mit 4-Hydroxyphenylacetaldehyd zu Norcocclaurin katalysiert, konnte in Suspensionskulturen aus zwei benzyloisochinolinhaltigen Pflanzenfamilien und in Kapseln und Pflanzen von Papaver somniferum nachgewiesen werden.
4. Die SAM:(R,S)-Norcocclaurin 6-O-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.), die die Übertragung einer Methylgruppe vom Co-substrat SAM auf die 6-O-Position von (R)- bzw. (S)-Norcocclaurin katalysiert, wurde in Suspensionskulturen aus vier benzyloisochinolinhaltigen Pflanzenfamilien nachgewiesen.

5. Ein neues Enzym, die SAM:(S)-Coclaurin N-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.) konnte entdeckt und aus Tinospora cordifolia Suspensionskulturen isoliert und gereinigt werden. Ein fünfstufiges Reinigungsverfahren ermöglichte mit einer Ausbeute von 9% die 115-fache Anreicherung des Enzyms.
6. Eigenschaften der (S)-Coclaurin-N-Methyltransferase:
Das Enzym katalysiert absolut stereoselektiv die Übertragung einer Methylgruppe vom Cosubstrat SAM auf (S)-Coclaurin und (S)-Norcoclaurin; weder die übrigen 16 getesteten Benzylisochinoline noch die (R)-Enantiomere der oben genannten Substrate erwiesen sich als metabolisch aktiv. Die K_M -Werte betragen für (S)-Coclaurin 36 μM , für (S)-Norcoclaurin 52 μM und für SAM 44 μM . Der K_I -Wert für den kompetitiven Inhibitor SAH wurde mit 62 μM bestimmt. Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltrationschromatographie zu 83 - 87 kD ermittelt. Das Enzym entfaltet seine optimale katalytische Aktivität bei pH 8,6 und zwischen 34 und 37°C.
7. In Suspensionskulturen aus fünf benzylisochinolinhaltigen Pflanzenfamilien wurde eine Coclaurin-N-methylierende Enzymaktivität nachgewiesen, die außer bei einigen Vertretern der Menispermaceae nicht zwischen den Stereoisomeren von Coclaurin differenziert.
8. Aus Berberis stolonifera Suspensionskulturen konnte eine Phenolase (Monophenol,L-Dopa:Oxygen Oxidoreductase; E.C. 1.14.18.1) isoliert und mit 19% Ausbeute zur Homogenität gereinigt werden. Das Reinigungsverfahren umfaßte neben vier säulenchromatographischen Schritten eine präparative isoelektrische Fokussierung, durch die zwei Phenolaseaktivitäten mit den isoelektrischen Punkten 4,25 und 3,95 isoliert werden konnten. Zur Charakterisierung der Phenolase wurde nur das Hauptenzym (IEP 4,25; 87% der Gesamt-

aktivität) herangezogen.

9. Eigenschaften der Phenolase:

Das Enzym differenziert nicht zwischen dem Benzylisochinolingerrüst und einfachen phenolischen Verbindungen und zeigt keine Stereoselektivität. Die K_M -Werte betragen für Tyramin 0,29 mM, Tyrosin 0,83 mM, (R)-Cocclaurin 0,63 mM, (S)-Cocclaurin 0,75 mM und (R,S)-N-Methylcocclaurin 0,58 mM.

Das Molekulargewicht der Phenolase wurde im nativen Zustand zu 60 kD und unter denaturierenden Bedingungen zu 36 kD bestimmt. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,0, das Temperaturoptimum zwischen 18 und 30°C.

Die Phenolaseaktivität wird sowohl durch die Kupferchelatlbildner Diethyldithiocarbamat und Bathocuproin als auch durch andere Metallionenkomplexbildner wie KCN, Natriumazid, Thioharnstoff und Dipicolinsäure gehemmt.

10. Es wurde ein Radioimmuntest zur quantitativen Bestimmung von (R)- und (S)-Cocclaurin aufgebaut. Zur Darstellung der Konjugate wurden die Enantiomere der Cocclaurin-N-Propionsäure mit Hilfe einer modifizierten Carbodiimid-Reaktion an Rinderserumalbumin gekoppelt. Die erzeugten (R)- und (S)-Cocclaurin-Antiseren besitzen hohe Affinitätskonstanten von $0,97 \times 10^9$ l/mol bzw. $1,5 \times 10^9$ l/mol.

11. Die für (R)- und (S)-Cocclaurin entwickelten Radioimmuntests zeichnen sich durch niedrige Nachweisgrenzen aus (156 bzw. 125 fmol). Die gegen (R)- und (S)-Cocclaurin gerichteten Antikörper erkennen sehr spezifisch die Stereokonfiguration am C-1-Atom und das Methylierungsmuster im Ring A. Signifikante Kreuzreaktionen treten bei solchen Verbindungen auf, die sich von Cocclaurin im Substitutionsmuster im Ring C und/oder in der Derivatisierung des Stickstoffs unterscheiden.

12. Zur radioimmunologischen Bestimmung von (R)- und (S)-Cocclaurin in Pflanzen, Pflanzenteilen und Zellkulturen wurden Rohextrakte mit Hilfe hochauflösender Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und analysiert. In allen 11 untersuchten Vertretern aus 5 benzyloisochinonhaltigen Pflanzenfamilien konnten (R)- und/oder (S)-Cocclaurin nachgewiesen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAM, G.E.: Radioimmunoassay of Steroids in Biological Fluids.
J. Steroid. Biochem. 6, 261 - 270 (1975)
- ALIMOVA, M., ISRAILOV, I.A., YUNUSOV, M.S., YUNUSOV, S.Y.: Alkaloids of Fumaria parviflora.
Khim. Priir. Soedin. 5, 642 - 644 (1982a)
Chem. Abstr. 98:104282
- ALIMOVA, M., ISRAILOV, I.A., YUNUSOV, M.S., ABDULLAEV, N.D., YUNUSOV, S.Y.: Corydalis paniculigera Alkaloids.
Khim. Priir. Soedin. 6, 727 - 731 (1982b)
Chem. Abstr. 98:122821
- AMANN, M.: (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase. Das zentrale Enzym in der Oxidation von Benzylisochinolin Alkaloiden.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1986)
- AMANN, M., WANNER, G., ZENK, M.H.: Intracellular Compartmentation of two Enzymes of Berberine Biosynthesis in Plant Cell Cultures.
Planta 167, 310 - 320 (1986)
- ANDERSON, G.W., ZIMMERMAN, J.E., CALLAHAN, F.M.: The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis.
J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 - 1842 (1964)
- ARENS, H.: Radioimmuntests für die Bestimmung von Indolalkaloiden.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1979)
- ARENS, H., ULBRICH, B., BORBE, H.O., FISCHER, H., KESSELRING, K.: Detection of Biologically Active Protoberberine and Proaporphine Alkaloids from Inospora cordifolia Cell Suspension Culture by Radio Receptor Binding Studies.
Abstract of Posters: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. International Symposium (1984)
- ARNDT, R.R.: (-)-N-Methylcoclaurine from Phyllica rogersii Pillans.
J. Chem. Soc. 2547 - 2549 (1963)
- ASGHAR, S.S., SIDDIQI, M.: Phenolase of Papaver somniferum. I. Isolation of the Enzyme and its Substrate Specificity.
Enzymologia 39, 289 - 306 (1970)
- BAR-NUN, N., MAYER, A.M.: Suppression of Catechol Oxidase by Norleucine in Plant Suspension Cultures.
Phytochemistry 22, 1329 - 1333 (1983)
- BARTON, D.H.R., COHEN, T.: Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation. Festschrift Arthur Stoll.
Birkhäuser Verlag, Basel 117 - 144 (1957)

- BARTON, D.H.R., HESSE, R.H., KIRBY, G.W.: The Origine of the "Berberine Carbon".
Proc. Chem. Soc. 267 - 268 (1963)
- BARTON, D.H.R., HESSE, R.H., KIRBY, G.W.: Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part VIII. Investigations on the Biosynthesis of Berberine and Protopine.
J. Chem. Soc. 6379 - 6389 (1965a)
- BARTON, D.H.R., KIRBY, G.W., STEGLICH W., THOMAS, G.M., BATTERSBY, A.R., DOBSON, T.A., RAMUZ, H.: Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids.
J. Chem. Soc. 2423 - 2438 (1965b)
- BARTON, D.H.R., BHAKUNI, D.S., CHAPMAN, G.M., KIRBY, G.W.: The Biosynthesis of Roemerine, Anonaine and Mecambrine.
Chem. Commun. 259 - 260 (1966a)
- BARTON, D.H.R., KIRBY, G.W., WIECHERS, A.: The Biosynthesis of Epistephanine and the Structure of Stebisimine.
Chem. Commun. 266 - 267 (1966b)
- BARTON, D.H.R., BHAKUNI, D.S., CHAPMAN, G.M., KIRBY, G.W., HAYNES, L.J., STUART, K.L.: Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part XIV. (Alkaloids from Croton Species. Part VII). The Biosynthesis of Crotonosine.
J. Chem. Soc. (C) 1295 - 1298 (1967)
- BATTERSBY, A.R., HARPER, B.J.T.: Biogenesis of Papaverine.
Proc. Chem. Soc. 152 (1959)
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R.: Biosynthesis of Morphine: Formation of Morphine from Norlaudanosoline.
Proc. Chem. Soc. 360 - 361 (1960)
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., LeCOUNT, D.J.: Biosynthesis of Morphine.
Proc. Chem. Soc. 287 (1960)
- BATTERSBY, A.R.: Alkaloid Biosynthesis.
Quart. Rev. 15, 259 - 286 (1961)
- BATTERSBY, A.R., HARPER, B.J.T.: Alkaloid Biosynthesis. Part I. The Biosynthesis of Papaverine.
J. Chem. Soc. 3526 - 3533 (1962)
- BATTERSBY, A.R., McCALDIN, D.J.: Biosynthesis of Narcotine.
Proc. Chem. Soc. 365 - 366 (1962)
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., HARPER, J.T.: Alkaloid Biosynthesis. Part II. The Biosynthesis of Morphine.
J. Chem. Soc. 3534 - 3546 (1962)

- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J.: Alkaloid Biosynthesis. Part V. Experiments on Opium Alkaloids Using 3,4-Dihydroxyphenylethylamine. J. Chem. Soc. 4078 - 4080 (1964)
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., FRANCIS, R.J., McCALDIN, D.J., RAMUZ, H.: Alkaloid Biosynthesis. Part IV. 1-Benzylisoquinolines as Precursors of Thebaine, Codeine and Morphine. J. Chem. Soc. 3600 - 3610 (1964)
- BATTERSBY, A.R., HIRST, M.: Concerning the Biosynthesis of Narcotine. Tetrahedron Lett. 11, 669 - 673 (1965)
- BATTERSBY, A.R., FOULKES, D.M., BINKS, R.: Alkaloid Biosynthesis. Part VIII. Use of Optically Active Precursors for Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. 3323 - 3332 (1965a)
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J., RUVEDA, E.A., STAUNTON, J.: Biosynthesis of Chelidone and Stylopine. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 89 - 91 (1965b)
- BATTERSBY, A.R., MARTIN, J.A., BROCHMANN-HANSEN, E.: Alkaloid Biosynthesis. Part X. Terminal Steps in the Biosynthesis of the Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. (C) 1785 - 1788 (1967)
- BATTERSBY, A.R., JONES, R.C.F., KAZLAUSKAS, R.: Experiments on the Early Steps of Morphine Biosynthesis. Tetrahedron Lett. 22+23, 1873 - 1876 (1975)
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. Anal. Biochemistry 70, 241 - 250 (1976)
- BERGMEYER, H.U.: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, New York (1977)
- BHAKUNI, D.S., SINGH, A.N., TEWARI, S., KAPIL, R.S.: Biosynthesis of Reticuline. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1662 - 1666 (1977)
- BHAKUNI, D.S., SINGH, A.N., JAIN, S.: Biosynthesis of Oxyacanthine. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1318 - 1321 (1978a)
- BHAKUNI, D.S., SINGH, A.N., JAIN, S., KAPIL, R.S.: Absolute Configuration and Biosynthesis of Tiliacrine and Tiliacrinine. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 226 - 228 (1978b)
- BHAKUNI, D.S., SINGH, A.N., JAIN, S.: Biosynthesis of Isotetrandrine. Tetrahedron 36, 2149 - 2151 (1980)
- BHAKUNI, D.S., JAIN, S.: The Biosynthesis of the Alkaloids of Croton sparsiflorus Morong. Tetrahedron 37, 3175 - 3181 (1981)

- BHAKUNI, D.S., JAIN, S.: Biosynthesis of Thalicarpine.
Tetrahedron 38, 729 - 732 (1982)
- BHAKUNI, D.S., GUPTA, S., JAIN, S.: The Biosynthesis of the Alkaloids of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers.
Tetrahedron 39, 4003 - 4010 (1983)
- BICK, I.R.C., SEVENET, T., SINCHAE, W., SKELTON, B.W., WHITE, A.H.: Alkaloids of *Cryptocarya longifolia*: X-Ray Crystal Structure of Thalifoline and Longifolonine.
Aust. J. Chem. 34, 195 - 207 (1981)
- BISSET, N.G.: Plants as a Source of Isoquinoline Alkaloids.
In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.)
Springer-Verlag, Berlin 1 - 22 (1985)
- BISSWANGER, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik.
Verlag Chemie, Weinheim (1979)
- BLACKSHEAR, P.J.: Systems for Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
In: Methods of Enzymology. Jacoby, W.B. (ed.)
Academic Press, New York 104, 237 - 255 (1984)
- BOBBITT, J.M., KULKARNI, C.L., WIRIYACHITRA, P.: Decarboxylation of Phenolic Tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic Acids in Air.
Heterocycles 4, 1645 - 1648 (1976)
- BONIWELL, J.M., BUTT, V.S.: Flavin Nucleotide-Dependent 3-Hydroxylation of 4-Hydroxyphenylpropanoid Carboxylic Acids by Particulate Preparations from Potato Tubers.
Z. Naturforsch. 41c, 56 - 60 (1986)
- BORKOWSKI, P.R., HORN, J.S., RAPOPORT, H.: Role of 1,2-Dehydroreticulium Ion in the Biosynthetic Conversion of Reticuline to Thebaine.
J. Am. Chem. Soc. 100, 276 - 281 (1978)
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
Anal. Biochemistry 72, 248 - 254 (1976)
- BROCHMANN-HANSEN, E.: A Second Pathway for the Terminal Steps in the Biosynthesis of Morphine.
Planta Medica 50, 343 - 345 (1984)
- BROCHMANN-HANSEN, E.: Biosynthesis of Morphinan Alkaloids.
In: The Chemistry and Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids. Phillipson, J.D., Roberts, M.F., Zenk, M.H. (eds.)
Springer-Verlag, Berlin 229 - 239 (1985)

- CARROLL, F.I., MORELAND, C.G., BRINE, G.A., KEPLER, J.A.: Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Morphine Alkaloids. *J. Org. Chem.* 41, 996 - 1001 (1976)
- CASTEDO, L., SAA, J.M., SUAU, R., VILLAVERDE, C., POTIER, P.: Litsea triflora Alkaloids. *An. Quim. Ser. C* 76, 171 - 174 (1980)
Chem. Abstr. 94:6T694
- CHALANDRE, M.C., JACQUEMIN, H., BRUNETON, J.: Study of Hernandiaceae. X. Isoquinoleic Alkaloids from Sparattanthelium uncigerum. *J. Nat. Prod.* 48, 333 (1985)
- CHARD, T., MARTIN, M., LANDON, J.: Separation of Antibody Bound from Free Peptides Using Ammonium Sulphate and Ethanol. In: *Radioimmunoassay Methods*. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.). Edinburgh und London, 257 - 265 (1971)
- CHARD, T.: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam 6 (1978)
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1981)
- COUTTS, I.G.C., HAMBLIN, M.R., TINLEY, E.J.: The Enzymatic Oxidation of Phenolic Tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic Acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2744 - 2750 (1979)
- DIESPERGER, H., MÜLLER, C.R., SANDERMANN, H. Jr.: Rapid Isolation of a Plant Microsomal Fraction by Mg^{2+} -Precipitation. *FEBS Lett.* 43, 155 - 158 (1974)
- DIXON, M.: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* 55, 170-171 (1953)
- DORNER, W.G.: Opiode - wenn der Schmerz zur Qual wird. *Pharm. in uns. Zeit* 2, 33 - 46 (1986)
- DUCKWORTH, H.W., COLEMAN, J.E.: Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 245, 1613 - 1625 (1970)
- FAUST, J., PREISS, A., RIPPBERGER, H., SANDOVAL, D., SCHREIBER, K.: Alkaloide aus Annona cristalensis. *Pharmazie* 36, 713 (1981)
- FELLMAN, J.H.: The Rearrangement of Epinephrine. *Nature* 182, 311 - 312 (1958)

- FERRARI, G., CASAGRANDE, C.: Ocotea Alkaloid for Relief of Anxiety.
U.S. Patent Nr. 3,900,564 (1975)
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim (1983)
- FRENZEL, T.: Enzymatische Untersuchungen zur Biosynthese der Benzylisochinolin- und Protoberberin-Alkaloide.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1987)
- FREY, M.D., RADOLA, B.J.: High Resolution Preparative Isoelectric Focusing in Layers of Granulated Gels.
Electrophoresis 3, 216 - 226 (1982)
- FUJII, T., KANEDA, T.: Purification and Properties of NADH/NADPH-Dependent p-Hydroxybenzoate Hydroxylase from Corynebacterium cyclohexanicum.
Eur. J. Biochem. 147, 97 - 104 (1985)
- FURUYA, T., NAKANO, M., YOSHIKAWA, T.: Biotransformation of (R,S)-Reticuline and Morphinan Alkaloids by Cell Cultures of Papaver somniferum.
Phytochemistry 17, 891 - 893 (1978)
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells.
Exp. Cell. Res. 50, 151-158 (1968)
- GEAR, J.R., SPENSER, I.D.: Biosynthesis of Hydrastine.
Nature 191, 1393 - 1395 (1961)
- GEAR, J.R., SPENSER, I.D.: The Biosynthesis of Hydrastine and Berberine.
Can. J. Chem. 41, 783 - 803 (1963)
- HAHN, G., STIEHL, K.: Über β -(Oxy-phenyl)-äthylamine und ihre Umwandlungen. IV. Mitteil.: Synthese von Tetrahydroisochinolin-carbonsäuren und die spontane Decarboxylierung von α -Ketonsäuren unter physiologischen Bedingungen.
Chem. Ber. 69, 2627 - 2634 (1936)
- HARTMEIER, W.: Immobilisierte Biokatalysatoren - auf dem Weg zur zweiten Generation.
Naturwissenschaften 72, 310 - 314 (1985)
- HASHIMOTO, T., YAMADA, Y.: Hyoscyamine 6 β -Hydroxylase, a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, in Alkaloid-Producing Root Cultures.
Plant Physiol. 81, 619 - 625 (1986)
- HASLAM, E.: Secondary Metabolism - Fact and Fiction.
Nat. Prod. Reports 3, 217 - 249 (1986)

- HAYNES, L.J., STUART, K.L., BARTON, D.H.R., BHAKUNI, D.S., KIRBY, G.W.: On the Biosynthesis of Crotonosine.
Chem. Commun. 141 - 142 (1965)
- HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.
Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1984)
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Enzymic Reduction of Codeinone in vitro Cell-Free Systems from Papaver somniferum and P. bracteatum.
Phytochemistry 19, 1681 - 1684 (1980)
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Enzymic Conversion of Reticuline to Salutaridine by Cell-Free Systems of Papaver somniferum.
Biochemistry 21, 3729 - 3734 (1982)
- HOLLAND, H.L., JEFFS, P.W., CAPPS, T.M., McLEAN, D.B.: The Biosynthesis of Protoberberine and Related Isoquinoline Alkaloids.
Can. J. Chem. 57, 1588 - 1597 (1979)
- IRGASHEV, T., ISRAILOV, I.A., BATSUREN, D., YUNUSOV, M.S.: Corydalis stricta Alkaloids.
Khim. Priir. Soedin. 4, 490 - 493 (1983)
Chem. Abstr. 100:82695
- IRGASHEV, T., ISRAILOV, I.A.: Alkaloids of Corydalis gortschakovii.
Khim. Priir. Soedin. 2, 260 (1984)
Chem. Abstr. 101:69362
- JOHNS, S.R., LAMBERTON, J.A., SIOUMIS, A.A.: 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Alkaloids from Alseodaphne archboldiana (Allen) Kostermans.
Aust. J. Chem. 20, 1729 - 1735 (1967a)
- JOHNS, S.R., LAMBERTON, J.A., SIOUMIS, A.A.: Cassytha Alkaloids. IV. The Alkaloids of Cassytha racemosa Nees.
Aust. J. Chem. 20, 1457 - 1462 (1967b)
- JOHNS, S.R., LAMBERTON, J.A., SIOUMIS, A.A.: Alkaloids of Xylopiapapuana Diels.
Aust. J. Chem. 21, 1383 - 1386 (1968)
- KARIMOVA, S.U., ISRAILOV, I.A., YUNUSOV, M.S., YUNUSOV, S.Y.: Alkaloids of Glaucium fimbrilligerum.
Khim. Priir. Soedin. 2, 224 - 228 (1980)
Chem. Abstr. 93:110563
- KARIMOVA, S.U., ISRAILOV, I.A.: Alkaloids of Glaucium oxylobum.
Khim. Priir. Soedin. 2, 259 (1984)
Chem. Abstr. 101:69361
- KENTEN, R.H., MANN, P.J.G.: The Oxidation of Amines by Extracts of Pea Seedlings.
Biochem. J. 50, 360 - 369 (1952)

- KIMURA, I., KIMURA, M., YOSHIZAKI, M., YANADA, K., KADOTA, S., KIKUCHI, T.: Neuromuscular Blocking Action of Alkaloids from a Japanese Crude Drug "Shin-I" (Flos Magnoliae) in Frog Skeletal Muscle.
Planta Medica 48, 43 - 47 (1983)
- KLEINSCHMIDT, G., MOTHES, K.: Zur Physiologie und Biosynthese der Alkaloide von *Papaver somniferum*.
Z. Naturforsch. 14b, 52 - 56 (1959)
- KLEINSCHMIDT, G.: Beiträge zur Physiologie der Mohnalkaloide. Die Demethylierung des Kodeins zum Morphin in der Mohnpflanze.
Pharmazie 15, 663 - 664 (1960)
- KOSHIYAMA, H., OHKUMA, H., KAWAGUCHI, H., HSÜ, H.-Y., CHEN, Y.-P.: Isolation of 1-(p-Hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (demethylcoclaurine), an Active Alkaloid from *Nelumbo nucifera*.
Chem. Pharm. Bull. 18, 2564 - 2568 (1970)
- KOSUGE, T., YOKOTA, M.: Studies on Cardiac Principle of Aconite Root.
Chem. Pharm. Bull. 24, 176 - 178 (1976)
- KOSUGE, T., YOKOTA, M., NUKAYA, H., GOTOH, Y., NAGASAWA, M.: Studies on Antitussive Principles of *Asiasari Radix*.
Chem. Pharm. Bull. 26, 2284 - 2285 (1978)
- KRAUSZ, F.: Method for the Preparation of Codeinone from Thebaine.
U.S. Patent Nr. 3,112,323 (1963)
- KUNITOMO, J., YOSHIKAWA, Y., TANAKA, S., IMORI, Y., ISOI, K., MASADA, Y., HASHIMOTO, K., INOUE, T.: Alkaloids of *Nelumbo nucifera*.
Phytochemistry 12, 699 - 701 (1973)
- LEBOEUF, M., CAVÉ, A., TOUCHÉ, A., PROVOST, J., FORGACS, P.: Isolement de L'Higénamine a Partir de L'*Annona squamosa*; Interet des Résines Adsorbantes Macromoléculaires en Chimie Végétale Extractive.
J. Nat. Prod. 44, 53 - 60 (1981a)
- LEBOEUF, M., LEQUET, C., CAVÉ, A., DESCONCLOIS, J.F., FORGACS, P., JACQUEMIN, H.: Alkaloids of Annonaceae XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*.
Planta Medica 42, 37 - 44 (1981b)
- LEBOEUF, M., CAVÉ, A., EL TOHAMI, M., PUSSET, J., FORGACS, P., PROVOST, J.: Alkaloids of Annonaceae. XXXV. Alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*.
J. Nat. Prod. 45, 617 - 623 (1982)
- LEETE, E.: The Biogenesis of Morphine.
J. Am. Chem. Soc. 81, 3948 - 3951 (1959)

- LEETE, E.: Biosynthesis of the Alkaloids of Chelidonium majus. I. The Incorporation of Tyrosine into Chelidonine.
J. Am. Chem. Soc. 85, 473 - 475 (1963)
- LEETE, E., MURRILL, S.J.B.: The Incorporation of Dopamine into Chelidonine and Morphine.
Tetrahedron Lett. 3, 147 - 151 (1964)
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The Determination of Enzyme Dissociation Constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 - 666 (1934)
- LINSMAYER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures.
Physiol. Plant. 18, 100-127 (1965)
- LOEFFLER, S., STADLER, R., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Norcoclaurine as Biosynthetic Precursor of Thebaine and Morphine.
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1160 - 1162 (1987)
- LORD, J.M.: Endoplasmic Reticulum and Ribosomes.
In: Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells.
Hall, J.L., Moore, A.L. (eds.).
Academic Press, London, New York 119 - 134 (1983)
- LU, S.-T.: Alkaloids of Formosan Lauraceous Plants. II. Alkaloids of Machilus kusanoi. 2. Isolation of dl-Coclaurine.
Yakugaku Zasshi 83, 19 -21 (1963)
Chem. Abstr. 59:39743
- LU, S.-T.: Alkaloids of Formosan Lauraceous Plants. IX. Alkaloids of Cryptocarya chinensis and C. konishii.
Yakugaku Zasshi 86, 269 (1966)
Chem. Abstr. 65:2631
- LU, S.-T.: Alkaloids of Formosan Lauraceous Plants. XII. Alkaloids of Cryptocarya konishii and Machilus acuminatissimus.
Yakugaku Zasshi 87, 1278 - 1281 (1967)
Chem. Abstr. 68:59777
- MASON, H.S.: Structures and Functions of the Phenolase Complex.
Nature 177, 79 - 81 (1956)
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese.
Walter De Gruyter Verlag, Berlin (1968)
- MAYER, A.M., HAREL, E.: Polyphenol Oxidases in Plants.
Phytochemistry 18, 193 - 215 (1979)
- MAYER, A.M.: Polyphenol Oxidases in Plants - Recent Progress.
Phytochemistry 26, 11 - 20 (1987)

- McINTYRE, R.J., VAUGHAN, P.F.T.: Kinetic Studies on the Hydroxylation of p-Coumaric Acid to Caffeic Acid by Spinach-Beet Phenolase. *Biochem. J.* 149, 447 - 461 (1975)
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49, 333 - 369 (1913)
- MONKOVIC, I., SPENSER, I.D.: The Incorporation of Dopamine into Berberine. *Proc. Chem. Soc.* 223 (1964)
- MONKOVIC, I., SPENSER, I.D.: Biosynthesis of Berberine and Berberastine. *Can. J. Chem.* 43, 2017 - 2026 (1965)
- MÜLLER, R.: Calculation of Average Antibody Affinity in Antihapten Sera from Data Obtained by Competitive Radioimmunoassay. *J. Immunol. Meth.* 34, 345 - 352 (1980)
- MUTSCHLER, E.: Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1981)
- NEUBAUER, D.: Zur Biosynthese des Thebains aus Tyrosin in Papaver bracteatum. *Arch. Pharm.* 298, 737 - 741 (1965)
- NEUHOFF, V., STAMM, R., EIBL, H.: Clear Background and Highly Sensitive Protein Staining with Coomassie Blue Dyes in Polyacrylamide Gels: A Systematic Analysis. *Electrophoresis* 6, 427 - 448 (1985)
- NIELSEN, B., ROE, J., BROCHMANN-HANSEN, E.: Oripavine - A New Opium Alkaloid. *Planta Medica* 48, 205 - 206 (1983)
- NIETO, M., SEVENET, T., LEBOEUF, M., CAVE, A.: Plantes de Nouvelle Calédonie. XL. Alcaloides des Annonacees: Alcaloides du Xylopiapancheri. *Planta Medica* 30, 48 - 58 (1976)
- OTSUKA, H., OGIHARA, Y., SHIBATA, S.: Isolation of Coclaurine from Zizyphus jujuba by Droplet Counter-Current Chromatography. *Phytochemistry* 13, 2016 (1974)
- PACHECO, P., ALBONICO, S.M., SILVA, M.: Alkaloids, Triterpenes and other Constituents of Discaria crenata. *Phytochemistry* 12, 954 - 955 (1973)
- PANICHANUN, S., BICK, I.R.C., BLUNT, J.W.: Alkaloid Occurrence in Discaria toumatou. *J. Nat. Prod.* 45, 777 - 778 (1982)

- PANICHANUN, S., BICK, I.R.C.: Variability in Alkaloid Content of Discaria pubescens.
Planta Medica 50, 454 (1984)
- PARISH, R.W.: The Intracellular Location of Phenol Oxidases, Peroxidase and Phosphatases in the Leaves of Spinach Beet (Beta vulgaris L. Subspecies vulgaris).
Eur. J. Biochem. 31, 446 - 455 (1972)
- PARKER, H.I., BLASCHKE, G., RAPOPORT, H.: Biosynthetic Conversion of Thebaine to Codeine.
J. Am. Chem. Soc. 94, 1276 - 1282 (1972)
- PETIARD, V., BAUBAULT, C., BARIAUD, A., HUTIN, M., COURTOIS, D.: Studies on Variability of Plant Tissue Cultures for Alkaloid Production in Catharanthus roseus and Papaver somniferum Callus Cultures.
In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E. (eds.).
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 133 - 142 (1985)
- PICTET, A., SPENGLER, T.: Über die Bildung von Isochinolinderivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenylalanin und Tyrosin.
Chem. Ber. 44, 2030 - 2036 (1911)
- PRAKASH, O., BHAKUNI, D.S., KAPIL, R.S.: Biosynthesis of Coclaurine.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1515 - 1518 (1979)
- PREININGER, V.: The Pharmacology and Toxicology of the Papaveraceae Alkaloids.
In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.)
Academic Press, New York 15, 207 - 261 (1975)
- RAPOPORT, H., LEVY, N., STERMITZ, F.R.: Distribution of Radioactivity in Morphine from Biosynthesis with $^{14}\text{CO}_2$.
J. Am. Chem. Soc. 83, 4298 - 4300 (1961)
- ROBERTS, M.F.: Polyphenolases in the 1000 g Fraction of Papaver somniferum Latex.
Phytochemistry 10, 3021 - 3027 (1971)
- ROBINSON, R.: A Theory of the Mechanism of the Phytochemical Synthesis of Certain Alkaloids.
J. Chem. Soc. 111, 876 - 899 (1917)
- RÜFFER, M., EL-SHAGI, H., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Norlaudanoline Synthase: The First Enzyme in the Benzyloisoquinoline Biosynthetic Pathway.
FEBS Lett. 129, 5 - 9 (1981)

- RÜFFER, M., NAGAKURA, N. ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of S-Adenosylmethionin:(R),(S)-Norlaudanoline-6-O-Methyltransferase from Argemone platyceras Cell Cultures. Planta Medica 49, 131 - 137 (1983)
- RÜFFER, M., ZENK, M.H.: Distant Precursors of Benzylisoquinoline Alkaloids and their Enzymatic Formation. Z. Naturforsch. 42c, 319 - 332 (1987)
- SANDERMANN, W.: Dien-Anlagerungsverbindungen des Thebains. Ber. Chem. Ges. 71, 648 - 650 (1938)
- SAWA, Y.K., TSUJI, N., MAEDA, S.: Elimination of the 4-Hydroxyl Group of the Alkaloids Related to Morphine-I. Tetrahedron 15, 144 - 153 (1961)
- SCHÖPF, C., BAYERLE, H.: Zur Frage der Biogenese der Isochinolinalkaloide. Die Synthese des 1-Methyl-6,7-dioxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolins unter physiologischen Bedingungen. Ann. Chem. 513, 190 - 202 (1934)
- SCHÖPF, C., SALZER, W.: Zur Frage der Biogenese der 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolinalkaloide. Die Synthese des 1-(3',4'-Methylenedioxy-benzyl)-6,7-dioxy-1,2,3,4-tetrahydro-isochinolins unter zellmöglichen Bedingungen. Ann. Chem. 544, 1 - 30 (1940)
- SCHRÖDER, E., RUFER, C., SCHMIECHEN, R.: Pharmazeutische Chemie. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1982)
- SCHUMACHER, H.M.: Reinigung und Charakterisierung einer Norlaudanosolin Synthese aus pflanzlichen Zellkulturen. Schriftl. Hausarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1981)
- SCHUMACHER, H.M., RÜFFER, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudanosoline Synthase from Eschscholtzia tenuifolia Cell Cultures. Planta Medica 48, 212 - 220 (1983)
- SCOTT, I., LEE, S.-L., HIRATA, T.: The Early Stages of Papaver Alkaloid Biosynthesis. Cell-Free Synthesis of Benzylisoquinolines. Heterocycles 11, 159 - 163 (1978)
- SEGEL, I.H.: Biochemical Calculations. John Wiley & Sons, New York (1975)
- SHAMMA, M., ROTHENBERG, A.S.: The Alkaloids of Thalictrum dioicum. Lloydia 41, 169 - 178 (1978)
- SOWEMIMO, B.O., BEAL, J.L., DOSKOTCH, R.W., SVOBODA, G.H.: Isolation of Stepharine and Coclaurine from Sarcopetalum harveyanum. Lloydia 35, 90 - 91 (1972)

- SPENSER, I.D., GEAR, J.R.: Biosynthesis of Berberine.
Proc. Chem. Soc. 228 - 229 (1962)
- SPENSER, I.D.: The Biosynthesis of Alkaloids and other Nitrogenous Secondary Metabolites.
In: Comprehensive Biochemistry; Florkin, M., Stotz, E.H. (eds.) Elsevier Amsterdam 20, 231 - 413 (1968)
- STADLER, R.: Die Biosynthese der Bisbenzylisochinolin-Alkaloide in *Berberis stolonifera* Zellkulturen.
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1986)
- STADLER, R., KUTCHAN, T.M., LOEFFLER, S., NAGAKURA, N., CASSELS, B., ZENK, M.H.: Revision of the Early Steps of Reticuline Biosynthesis.
Tetrahedron Lett. 28, 1251 - 1254 (1987)
- STAFFORD, H.A.: Characteristics of a 4-Hydroxycinnamate Hydroxylase Purified from Sorghum Leaves.
Plant Physiol. 57, 320 - 324 (1976)
- STAROS, J.V.: N-Hydroxysulfosuccinimide Active Esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide)Esters of Two Dicarboxylic Acids Are Hydrophilic, Membrane-Impermeant, Protein Cross-Linkers.
Biochemistry 21, 3950 - 3955 (1982)
- STAROS, J.V., WRIGHT, R.W., SWINGLE, D.M.: Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions.
Analytical Biochemistry 156, 220 - 222 (1986)
- STEFFENS, P.: Reinigung und Charakterisierung des Berberinbrückenenzym aus Zellkulturen von *Berberis beaniana* Schneid.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984)
- STERMITZ, F.R., RAPOPORT, H.: The Biosynthesis of Opium Alkaloids. Alkaloid Interconversions in Papaver somniferum and P. orientale.
J. Am. Chem. Soc. 83, 4045 - 4050 (1961)
- SUND, C.: Bestimmung von Papaver-Alkaloiden und Pflanzenselektion mittels Radioimmunoassay.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1978)
- TANAHASHI, T., ZENK, M.H.: Isoquinoline Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Fumaria capreolata*.
Plant Cell Rep. 4, 96 - 99 (1985)
- TEITEL, S., BROSSI, A.: An Improved Synthesis of Various Racemic Polyphenolic Tetrahydroisoquinoline Alkaloids.
J. Het. Chem. 5, 825 - 829 (1968)

- TOMITA, M., KUSUDA, F.: Alkaloids of Menispermaceae. VIII. Alkaloids of *Cocculus laurifolius*. Supp. J. Optical Rotation of Coccolaurine.
J. Pharm. Soc. Japan 72, 203 - 206 (1952)
Chem. Abstr. 47:6430
- TORRES, R., DELLE MONACHE, F., MARINI BETTOLO, G.S.: Alkaloids from *Discaria serratifolia*.
J. Nat. Prod. 42, 430 - 431 (1979)
- ULLRICH, V., DUPPEL, W.: Iron- and Copper-Containing Monooxygenases. In: The Enzymes. Boyer, P.D. (ed.)
Academic Press, New York, San Francisco, London 12, 253 - 297 (1975)
- VEDERAS, J.C.: The Use of Stable Isotopes in Biosynthetic Studies.
Nat. Prod. Rep. 277 - 337 (1987)
- WAGNER, H., REITER, M., FERSTL, A.: New Drugs with Cardiotonic Activity. I. Chemistry and Pharmacology of the Cardiotonic Active Principle of *Annona squamosa* L.
Planta Medica 40, 77 - 85 (1980)
- WAT, C.-K., STEFFENS, P., ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of S-Adenosylmethionine Homocysteine-N-Methyltransferase from *Sorbus* Cell Suspension Cultures.
Z. Naturforsch. 47c, 126 - 134 (1992)
- WATANABE, K.: Pharmacology of the Constituents of the Cortex of *Magnolia officinalis* and *M. liliflora*.
Yakuei Tongao 20, 522 - 524 (1986)
Chem. Abstr. 104:179748
- WEBER, J.F., BRUNETON, J., PUSSET, J.: Plants of New Caledonia. Part 103. Alkaloids of *Litsea lecardii*.
Planta Medica (1) 74 - 75 (1988)
- WEETALL, H.H.: Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. In: Methods in Enzymology. Mosbach, K. (ed.)
Academic Press, New York 44, 134 - 147 (1976)
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and Related Compounds in *Digitalis lanata*.
Phytochemistry 15, 1537 - 1545 (1976)
- WEILER, E.W.: Die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin und verwandten Verbindungen in *Digitalis lanata* Ehrh.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1977)
- WEST, C.A.: Hydroxylases, Monooxygenases, and Cytochrome P-450. In: The Biochemistry of Plants. Davies, D.J. (ed.)
Academic Press, New York 3, 317 - 364 (1980)

- WIECZOREK, U.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Opiumalkaloiden in Papaver-Pflanzen und -Zellkulturen.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1985)
- WIECZOREK, U., NAGAKURA, N., SUND, C., JENDRZEJEWSKI, S., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay Determination of Six Opium Alkaloids and its Application to Plant Screening.
Phytochemistry 25, 2639 - 2646 (1986)
- WILSON, M.L., COSCIA, C.J.: Studies on the Early Stages of Papaver Alkaloid Biogenesis.
J. Am. Chem. Soc. 97, 431 - 432 (1975)
- WINTERSTEIN, E., TRIER, G.: Die Alkaloide.
Gebrüder Bornträger, Berlin (1910)
- WU, J., BEAL, J.L., WU, W., DOSKOTCH, R.W.: Alkaloids of Thalictrum. XXIV. Isolation and Identification of Alkaloids from the Tertiary Phenolic Fraction of Thalictrum revolutum Tops.
Lloydia 40, 593 - 601 (1977)
- ZAPPIA, V., ZYDEK-CWICK, C.R., SCHLENK, F.: The Specificity of S-Adenosylmethionine Derivatives in Methyl Transfer Reactions.
J. Biol. Chem. 244, 4499 - 4509 (1969)
- ZENK, M.H., RÜFFER, M., AMANN, M., DEUS-NEUMANN, B.: Benzyloisoquinoline Biosynthesis by Cultivated Plant Cells and Isolated Enzymes.
J. Nat. Prod. 48, 725 - 738 (1985)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk danke ich sehr herzlich für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas. Seine große Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit haben wesentlich zum Gelingen des Ganzen beigetragen.

Frau M. Oetzl danke ich für die Hilfe beim Aufbau des Radioimmuntests.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts, die mich während der ganzen Zeit geduldig mit Rat und Tat unterstützt haben.

LEBENS LAUF
von Susanne Löffler

- Geburtsdaten** geboren am 19.10.1960 in Freiburg i. Br.
als Tochter des Universitätsprofessors
Dr. Hans Löffler und seiner Ehefrau
Isolde, geb. Luz.
- Schul Ausbildung** 1966 - 1970 Grundschule Staufen
1970 - 1973 Faust-Gymnasium Staufen
1973 - 1979 Max-Born-Gymnasium Germering
27.6.1979 Abitur
- Berufsausbildung** Nov. 1979 - April 1983 Studium der Phar-
mazie an der Ludwig-Maximilians-Univer-
sität München
3.5.1983 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
Mai 1983 - Juni 1984 Pharmaziepraktikum
in der Amper-Apotheke Dachau
Juni 1984 3. Pharmazeutisches Staats-
examen
18.6.1984 Approbation als Apothekerin
seit Sept. 1984 Anfertigung der vorlie-
genden Arbeit unter Anleitung von
Prof.Dr. M.H. Zenk
- Berufstätigkeit** seit Sept. 1984 als wissenschaftliche
Hilfskraft am Institut für Pharmazeuti-
sche Biologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München.

